

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD (LYON I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1972 - N° 76

UTILISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE
POUR LA SÉPARATION ET LE DOSAGE DU PHÉNOL, DES CRÉSOLS
ET DES XYLÉNOLS URINAIRES.

ÉTUDE DES RÉSULTATS OBTENUS
CHEZ LES SUJETS EXPOSÉS AUX HYDROCARBURES BENZÉNIQUES.

Travail du Laboratoire de Chimie Analytique UER des Sciences Pharmaceutiques (Pr. BADINAND)
et de l'Institut Universitaire de Médecine du Travail (P. BOURRET).

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 7 Juillet 1972
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

Jean-Pierre CURTET

né le 29 Mars 1944

à JALLIEU (Isère)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552625_0015

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD (LYON I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1972 - N° 76

UTILISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE
POUR LA SÉPARATION ET LE DOSAGE DU PHÉNOL, DES CRÉSOLS
ET DES XYLÉNOLS URINAIRES.

ÉTUDE DES RÉSULTATS OBTENUS
CHEZ LES SUJETS EXPOSÉS AUX HYDROCARBURES BENZÉNIQUES.

Travail du Laboratoire de Chimie Analytique UER des Sciences Pharmaceutiques (Pr. BADINAND)
et de l'Institut Universitaire de Médecine du Travail (P. BOURRET).

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 7 Juillet 1972

pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

Jean-Pierre CURTET

né le 29 Mars 1944

à JALLIEU (Isère)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON

Président : Monsieur le Professeur J. BOLDIN

1er Vice Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences Agrégé

2ème Vice Président : M. P. PONCET, Maître-Assistant

3ème Vice Président : M. D. BETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

DIRECTEURS

U.E.R. médicale Grange-Blanche	M. le Professeur D. GERMAIN
U.E.R. médicale Alexis-Carrel	M. le Professeur C. GIROD
U.E.R. médicale LYON-Nord	M. le Professeur A. BERTOYE
U.E.R. médicale LYON-Sud-Ouest	M. le Professeur F. TOLOT
U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques	M. M. CARRAZ, Maître de Conférences Agrégé
U.E.R. des Techniques de Réadaptation	M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN
U.E.R. de Biologie Humaine	M. J.C. CZYBA, Maître de Conférences Agrégé
U.E.R. d'Education Physique et Sportive	M. A. MILLON, Professeur d'E.P.S.
U.E.R. des Sciences Odontologiques	M. R. VINCENT
U.E.R. de Mathématiques	M. le Doyen J. BRACONNIER
U.E.R. de Physique	M. le Professeur M. DUFAY
U.E.R. de Chimie et Biochimie	Melle le Professeur D. GAUTHERON
U.E.R. des Sciences de la Nature	M. le Professeur L. DAVID
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie	M. le Professeur R. FONTANGES
U.E.R. de Physique nucléaire	M. le Professeur A. SARAZIN
U.E.R. de Mécanique	M. le Professeur J. MATHIEU
Observatoire	M. le Professeur J.H. BIGAY
Institut Universitaire de Technologie 1	M. le Professeur B. POUYET
Institut Universitaire de Technologie 2	M. J. GALLET

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE.

A MA FEMME,

A MA FILLE,

A MA MERE,

A MON PERE,

A MES BEAUX-PARENTS,

A MA FAMILLE,

A MES AMIS.

A notre Président de thèse :

Monsieur le Professeur BADINAND,

Professeur de Chimie Analytique Pharmaceutique, Biologiste
des hôpitaux,

Nous lui sommes particulièrement reconnaissant de
nous avoir suivi et conseillé depuis notre entrée
à la Faculté, puis de nous avoir accepté au sein
de son équipe qu'il anime avec tant de bienveil-
lance.

Nous le remercions d'avoir bien voulu nous faire
le grand honneur de présider notre jury de thèse.
Qu'il veuille trouver ici l'assurance de notre
respectueux dévouement.

A nos juges :

Monsieur le Professeur BOURRET,

Nous le remercions d'avoir bien voulu nous faire
l'honneur de nous juger.

Qu'il soit assuré de notre profond respect.

Monsieur le Professeur PERROT,

Nous le remercions de son accueil toujours chaleureux.

Nous sommes heureux de le compter parmi nos juges
et nous le prions de trouver ici le témoignage de
notre vive gratitude.

Monsieur le Professeur TOLOT,

Nous le remercions d'avoir accepté d'être membre de notre jury et l'assurons de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur VALLON,

Pendant notre travail, il nous a fait partager ses connaissances et a su être attentif à nos problèmes.

Nous le remercions de l'attention qu'il a bien voulu nous témoigner en acceptant de juger ce travail, et nous l'assurons de notre réel dévouement.

Le travail que nous présentons est le résultat d'une étroite collaboration avec les médecins de Médecine du Travail.

Que tous ceux qui nous ont apporté leur aide veuillent bien trouver ici le témoignage de notre reconnaissance, et en particulier :

Monsieur GUILLUY,

Il a toujours porté un vif intérêt à notre travail et son aide nous fût précieuse.

Monsieur le Docteur GIRARD,

Il s'est toujours intéressé à nos résultats et nous a aidé à les interpréter.

Madame BACHELIER,

qui a effectué les dosages d'acide hippurique.

Mademoiselle DUCLOS,

qui nous a initié à la chromatographie en phase gazeuse.

Monsieur BIRON et Monsieur OBATON,

qui nous ont apporté une aide précieuse.

Ainsi que tous ceux qui ont participé à ce travail.

A nos maîtres de la Faculté et des Hôpitaux de LYON,

A notre maître de stage, Monsieur J. CONAN,

A nos camarades de l'Internat en Pharmacie des Hospices Civils
de LYON,

A tous ceux qui participent à l'activité du Laboratoire de
Chimie Analytique.

I N T R O D U C T I O N
=====

L'utilisation industrielle des hydrocarbures aromatiques est importante. Parmi ces composés, le benzène et ses homologues supérieurs, toluène et xylènes, occupent encore une grande place. Leurs propriétés physico-chimiques les font employer dans de nombreux domaines, mais leur utilisation répétée détermine une toxicité chronique qui a conduit à en réglementer l'emploi et à l'inscription du benzolisme sur la liste des maladies professionnelles.

Les principales propriétés de ces composés sont les suivantes :

- grande volatilité due à des tensions de vapeurs élevées, qui, en millimètres de mercure à 26°, sont de 100 pour le benzène, 30 pour le toluène et 11 pour les xylènes. Les vapeurs émises sont lourdes, leurs densités par rapport à l'air sont respectivement de 2,7 , 3,2 et 3,7.
- solvant des graisses et de nombreux composés organiques.
- réactivité chimique permettant la formation de dérivés d'addition ou de substitution.

Elles expliquent leur emploi comme diluants (peintures, colles, vernis, ...), détachants, solvants, réactifs de laboratoire, et, dans l'industrie, comme base de synthèse (produits chimiques, pharmaceutiques, plastiques, colorants, explosifs, ...).

La manipulation répétée des hydrocarbures benzéniques conduit à leur accumulation dans l'organisme provoquant, surtout avec le benzène, une atteinte de la moelle osseuse souvent irréversible, dont les signes hématologiques essentiels sont :

- une anémie hyperchrome modérée ($3,5$ à $4\ 000\ 000 / \text{mm}^3$) ;
- une légère leucocytopénie (4 à $5\ 000 / \text{mm}^3$) ou une leucocytose (10 à $12\ 000 / \text{mm}^3$) ;
- une éosinophilie (5 à $10\ \%$) inconstante et tardive ;
- une thrombocytopénie (100 à $150\ 000 / \text{mm}^3$) ;
- un allongement du temps de saignement ;
- un signe du lacet positif.

Ces signes sont moins marqués avec le toluène et les xylènes, pour lesquels seules des anémies et des leucocytopénies sont parfois observées.

Le contrôle hématologique est actuellement le moyen le plus utilisé pour dépister et surveiller les sujets exposés. Mais l'apparition tardive des troubles fait chercher des tests d'exposition plus précoces : dosage dans le sang ou l'air expiré des hydrocarbures, ou dosage de certains métabolites urinaires. Parmi ces métabolites, nous avons retenu le dosage des mono-phénols.

Ceci nous a conduit à étudier dans un premier chapitre, le métabolisme du benzène, du toluène et des xylènes puis, dans un deuxième chapitre, les méthodes de dosages de leurs métabolites urinaires, utilisées comme tests d'exposition ; le troisième chapitre est constitué par la technique mise au point, les résultats obtenus et leur interprétation.

- CHAPITRE PREMIER -

METABOLISMES DU BENZENE,
DU TOLUENE ET DES XYLENES
=====

- 3 -

Dans l'organisme, les hydrocarbures aromatiques, benzène, toluène et xylènes, ont deux possibilités de métabolisme. La première est un simple passage sans transformation et la seconde une biotransformation formant les métabolites oxygénés qui seront éliminés après ou sans conjugaison préalable.

I. PASSAGE DANS L'ORGANISME SANS TRANSFORMATION :

I.1. LES VOIES D'INTRODUCTION :

Dans les conditions habituelles de leurs emplois industriels, les hydrocarbures benzéniques pénètrent dans l'organisme essentiellement par voie pulmonaire et à un degré moindre par voie cutanée.

I.1.1. La voie pulmonaire :

Elle constitue la voie principale d'introduction du fait de la grande volatilité de ces composés. Une partie des hydrocarbures benzéniques inhalés est aussitôt exhalée par les poumons (240 - 162). La quantité exhalée dépend de la pression de vapeur du composé à la température corporelle ainsi que de sa concentration sanguine (51). Ceci explique que le taux exhalé est différent selon le moment de l'exposition : de 20 à 30 % au début (205), il passe très vite de 40 à 60 %, taux maintenu jusqu'à la fin de l'exposition (327 - 270). Ceci constitue la période de saturation qui, dès la fin de l'exposition, est suivie d'une période de désaturation pendant laquelle la quantité exhalée est variable selon l'hydrocarbure. Importante pour le benzène, de 30 à 70 % (343 - 149), elle diminue pour le toluène, de 5 à 25 % (346 - 345 - 322), pour devenir presque nulle avec les xylènes (137). Cette période

est plus ou moins longue ; ainsi, le benzène est retrouvé dans l'air expiré pendant au moins 24 heures (162).

I.1.2. La voie cutanée :

C'est une voie mineure accidentelle (fuite d'un appareil, nettoyage de la peau, ...). Elle a été étudiée par LAZAREV et Coll. (203), en 1930, qui, trempant une patte rasée d'un lapin dans du benzène, trouvent une absorption de 138 mg en 115 minutes. Plus récemment, MEYER et Coll. (223) ont mesuré chez la souris une vitesse d'absorption cutanée du benzène de 2,3 μ l/ml/heure. Une étude similaire, effectuée par DUTKIEWICZ et TYRAS (86) en 1968 sur l'homme, a permis de déterminer que les vitesses d'absorption cutanée étaient respectivement de 14 à 23 mg/cm²/heure et de 4,5 à 9,6 mg/cm²/heure, pour le toluène et les xylènes. Comme dans le cas de l'absorption pulmonaire, une partie des hydrocarbures est aussitôt exhalée dans l'air expiré.

Ainsi, après ces mécanismes d'absorption - élimination, il reste alors dans l'organisme :

30 à 70 %	du benzène
75 à 95 %	du toluène
plus de 95 %	des xylènes introduits.

I.2. CIRCULATION ET REPARTITION DANS L'ORGANISME :

Du fait de leur grande liposolubilité, environ 85 % des hydrocarbures benzéniques sanguins sont véhiculés, fixés sur les hématies. Le reste est dissout dans le plasma, probablement dans les

chylomicrons, ou adsorbé sur les lipoprotéines (139).

La concentration sanguine dépend de trois facteurs :

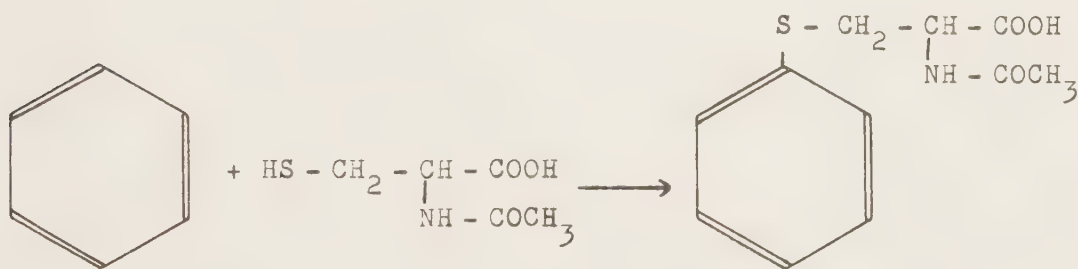
- le taux d'absorption,
- la quantité stockée,
- la vitesse de la biotransformation.

Ainsi, le benzène est plus vite éliminé du sang que les alkylbenzènes. Sa pression de vapeur à la température corporelle étant la plus élevée, il est exhalé en priorité par les poumons, voie d'élimination plus rapide que la biotransformation, voie prépondérante pour les alkylbenzènes. Le taux sanguin est différent dans le sang artériel et le sang veineux. Exposé à une concentration de 500 ppm de benzène, le taux sanguin atteint vite un palier plus élevé dans le sang artériel. D'autre part, la désaturation est plus rapide dans le sang veineux (308).

15 à 20 % du benzène et moins de 5 % du toluène inhalés restent fixés dans différents organes. Ceci a été étudié par SCHRENK et coll. (308), FABRE (102 - 110), PARKE et WILLIAMS (21), TSURUTA (366) et coll., soit par le dosage des hydrocarbures dans les différents organes, soit par la mesure de la radioactivité de ces derniers en utilisant un marquage de l'hydrocarbure au ^{14}C . Les résultats obtenus montrent une répartition des hydrocarbures aromatiques dans les organes riches en lipides, essentiellement les surrénales, le cerveau, le cervelet, la moelle osseuse et le foie, mais aussi les reins, la rate et les poumons. C'est l'électivité pour les centres nerveux qui expliquerait la toxicité de ces produits (108). La fraction fixée par les organes est libérée lentement puis suit la bio-oxydation.

I.3. ELIMINATION :

Dès les premiers temps de l'exposition, une faible partie (0,1 à 0,2 %) du benzène (259 - 327) et du toluène (328 - 346) est éliminée inchangée, par voie rénale. Une autre partie (0,11 à 0,37 %) du benzène (387) est condensée avec la cystéine acétylée, formant ainsi l'acide L-phényl mercapturique.



benzène + cystéine acétylée $\longrightarrow$ acide L-phényl mercapturique

Cette conjugaison a été pressentie par CALLOW et Coll. (56) dès 1926, en notant une diminution des sulfures corporels avec le benzène, mais pas avec le toluène. SBARSKY et Coll. (395) furent les premiers à avoir caractérisé l'acide L-phényl mercapturique dans les urines de rats après administration de benzène par tubage stomacal. C'est une voie mineure d'élimination du benzène qui n'est pas effectuée par toutes les espèces animales (363), entre-autres pas chez le lapin.

II. BIO-OXYDATION DES HYDROCARBURES BENZENIQUES :

II.1. GENERALITES :

Les métabolites des hydrocarbures benzéniques ont été mis en évidence dès la fin du siècle dernier par SCHULTZEN et NAUNYN, en

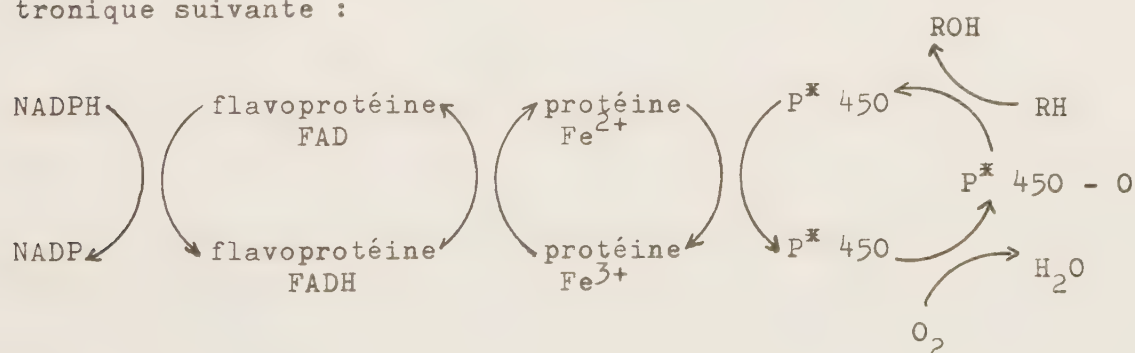
1867 (309), NENCKI et GIACOSA, en 1880 (239), BAUMANN et PREUSSE, en 1879 (27), CURCI en 1892 (69), FILLIPI en 1914 (114), JAFFE en 1909 (169), et FUCHS et SOOS en 1916 (128). Les métabolites qui sont des dérivés d'oxydation, phénols et acides aromatiques, expliqueraient mieux les différences de toxicité vis à vis de la moelle osseuse. En effet, la myélotoxicité serait due à la production de diphénols (107) qui n'a lieu que pour le benzène, principal myélotoxique des trois hydrocarbures. Ceci a été démontré récemment par NOMIYAMA (245 - 246) qui, injectant du benzène et des phénols à la souris, a trouvé que seuls les diphénols sont myélotoxiques et ont une myélotoxicité 100 fois plus grande que celle du benzène. D'autre part, TSURTA (366), injectant du benzène marqué au ^{14}C au lapin, ne retrouve pas de radioactivité dans la moelle osseuse après une injection isolée, mais en retrouve après une série d'injections. Cela lui suggère que ce n'est pas le benzène qui s'accumule dans la moelle osseuse mais ses métabolites. Le fait d'être oxydé en phénols constituerait donc pour le benzène une phase toxique.

II.2. MECANISMES ENZYMATIQUES DE L'OXYDATION :

Depuis les travaux de TSCHERNIKOFF en 1930 (365), le siège principal de l'oxydation des hydrocarbures est connu comme étant le foie. C'est pour cette raison que BOOTH et BOYLAND (38), puis POSNER et Coll. (272 - 273) ont étudié l'oxydation des hydrocarbures benzéniques par les microsomes hépatiques de lapin et de rat. Ils découvrent ainsi qu'il faut ajouter au milieu du NAD sous forme hydrogénée et du FAD, et que c'est l'oxygène de l'air qui est incorporé. Après des essais infructueux de SAKAMOTO et Coll. (293), SATO et Coll. (300) extraient un enzyme du foie de lapin qui, en présence de NADP et de citrate, transforme le benzène en phénol. MITOMA (226), puis IKEDA (163), pensent que l'enzyme hydroxylant

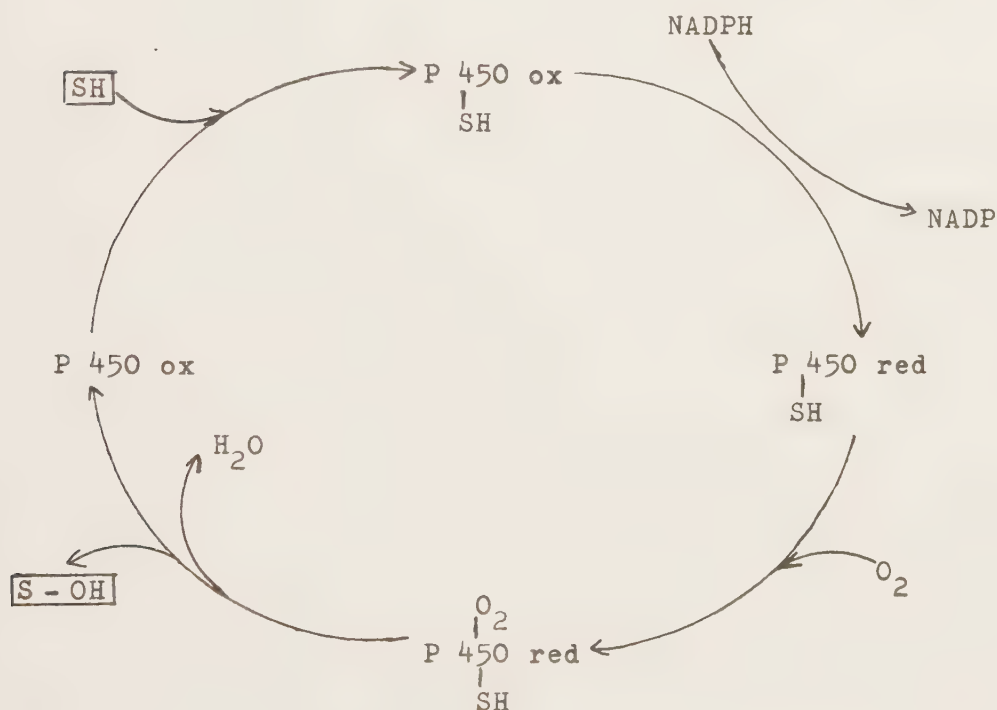
est la 4-aryl hydroxylase qui catalyse entre autres l'hydroxylation de l'aniline en para-amino phénol. De même, cet enzyme peut être rapproché de la tyrosinase qui catalyse l'oxydation du phénol en pyrocatechol (238). En fait, depuis les travaux d'OMURA et SATO, l'oxydation de nombreux corps, dont les hydrocarbures benzéniques, semble être sous la dépendance d'un pigment, le cytochrome P 450, mis en évidence dans les microsomes hépatiques puis surrénaliens (253). Deux hypothèses ont été émises sur le mécanisme d'action du cytochrome P 450.

- OMURA et SATO (253) pensent que le cytochrome P 450 sous forme réduite ($P^{*} 450$) est susceptible de fixer un atome d'oxygène, formant ainsi un complexe ($P^{*} 450 - O$). Celui-ci constitue une forme activée de l'oxygène qui peut alors se fixer sur la molécule organique. Une réductase, avec le NADPH comme coenzyme, réduit le cytochrome P 450 oxydé formé en $P^{*} 450$ réduit, ceci en présence d'une flavoprotéine et d'une protéine ferrique non hématinique présente dans les surrénales. Ils suggèrent la voie de transport électronique suivante :



- DAVIES (72), ESTABROOK (96), puis GILLETTE (142), pensent que le cytochrome P 450 oxydé (Fe^{3+}) forme un complexe ($P^{*} 450 - SH$) avec le substrat SH. Ce complexe est réduit par la NADPH - cytochrome C - réductase, présente dans les microsomes hépatiques. La réduction porte sur le fer ferrique de l'hème qui passe à l'état

ferreux (Fe^{2+}). Le complexe réduit peut ainsi fixer une molécule d'oxygène puis se décomposer, donnant naissance au substrat oxydé (S-OH) et au cytochrome P 450 oxydé. La voie de transport électronique serait alors la suivante :



Appliqués aux hydrocarbures benzéniques, ces mécanismes enzymatiques d'oxydation s'effectuent de manière différente selon le composé en cause (386). Pour le benzène, l'oxydation ne porte que sur le noyau, jusqu'à ouverture de ce dernier. Pour le toluène et les xylènes, elle s'effectue aussi sur la chaîne latérale, une seule chaîne pouvant être oxydée. Ainsi trois groupes de métabolites sont produits :

- les phénols,
- les acides aromatiques,
- les acides phénols.

II.3. LES PRODUITS D'OXYDATION :

II.3.1. Oxydation nucléaire :

C'est la seule voie de transformation pour le benzène et une voie secondaire pour le toluène et les xylènes.

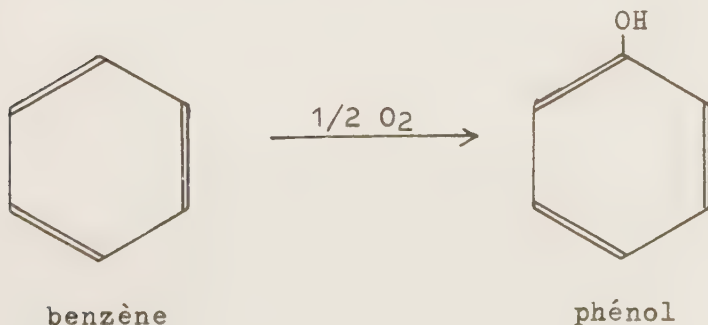
II.3.1.1. Benzène :

Environ 35 % du benzène inhalé subit cette oxydation. Les composés formés, d'après PARKE et WILLIAMS (259) sont les suivants :

- phénol 23 %
- hydroquinone 5 %
- pyrocatechol 2,5 %
- hydroxy hydroquinone 0,5 %
- acide muconique 1,5 %
- gaz carbonique 1,5 %

II.3.1.1.1. Formation du phénol :

C'est le métabolite principal constituant les deux tiers des produits d'oxydation du benzène. La formation directe, sans intermédiaire, est la plus probable.



Cependant, PORTEOUS et WILLIAMS (275), puis SATO et Coll. (299), pensent qu'il se forme un dérivé intermédiaire,

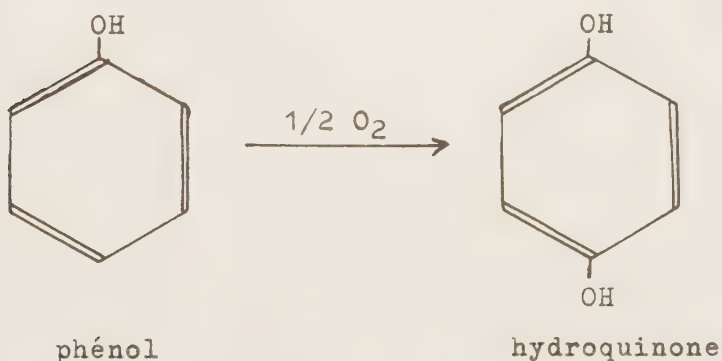
le benzène glycol (1-2 dihydro 1-2 dihydroxy benzène) qui, perdant une molécule d'eau, conduit au phénol (figure n° 1). Ce composé intermédiaire n'a jamais été mis en évidence chez l'homme lors d'une exposition au benzène.

D'autre part, SLOANE (319) a mis en évidence une voie secondaire comportant une hydroxyméthylation préalable du benzène qui, après oxydation poussée, conduit au phénol.

II.3.1.1.2. Formation des diphénols :

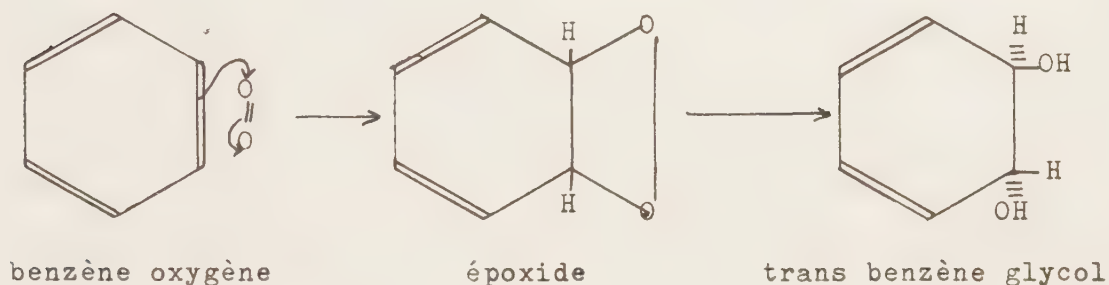
Sur les trois diphénols existants, deux seulement sont produits, les isomères ortho et para, le pyrocatéchol et l'hydroquinone.

L'hydroquinone est produite à partir du phénol, par oxydation directe en para :

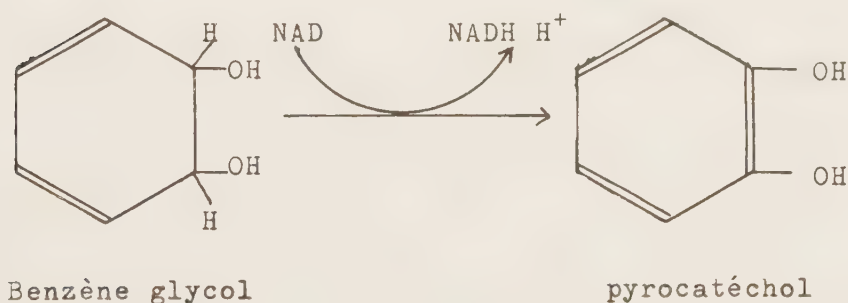


Le pyrocatéchol est aussi formé par cette voie, par une oxydation en ortho, mais il est certain qu'il provient aussi du benzène glycol. Ce serait une voie importante de formation en évitant le passage par le phénol. Ceci a été mis en évidence lors de l'oxydation du benzène par les bactéries (218 - 214 - 141). La formation du benzène glycol

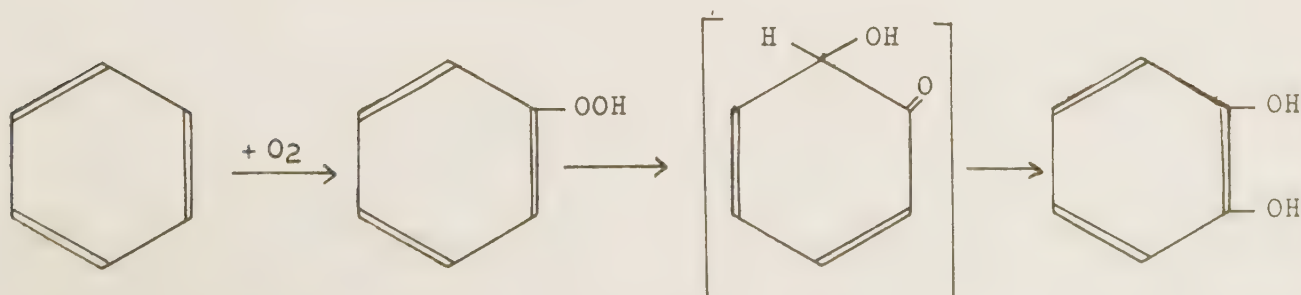
s'effectue par l'intermédiaire d'un epoxide conduisant à l'isomère trans.



Que le benzène glycol formé soit l'isomère cis ou trans (359), sous l'action d'une diol déshydrogénase avec le NAD comme coenzyme, mise en évidence par AYENGER et HAYAISHI (8), il conduit au pyrocatéchol.



Pour MAC KENNA (218), un autre intermédiaire serait possible entre le benzène et le pyrocatéchol. Il s'agirait du benzène hydroperoxide, qui, après remaniement interne, forme le pyrocatéchol.



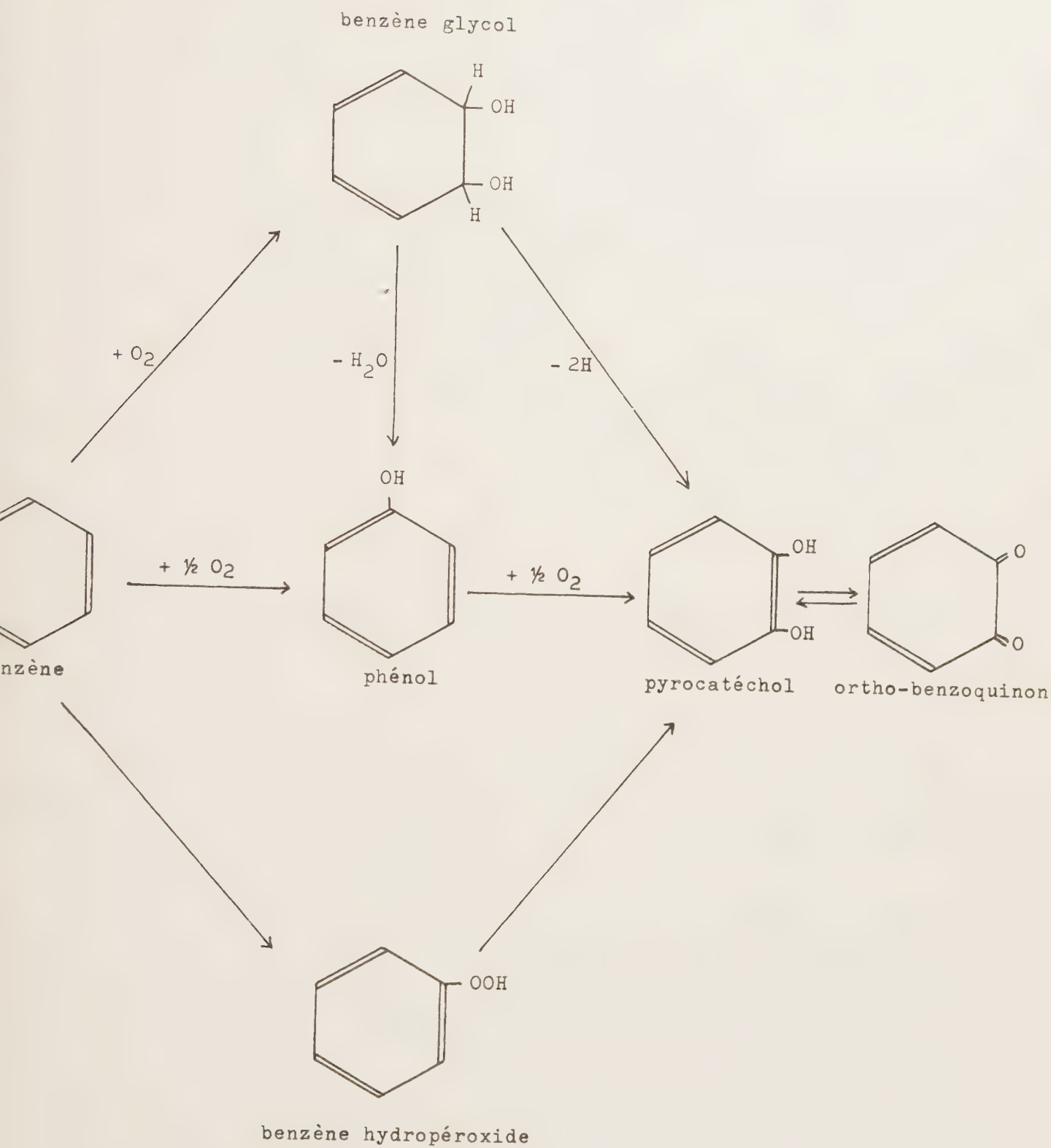
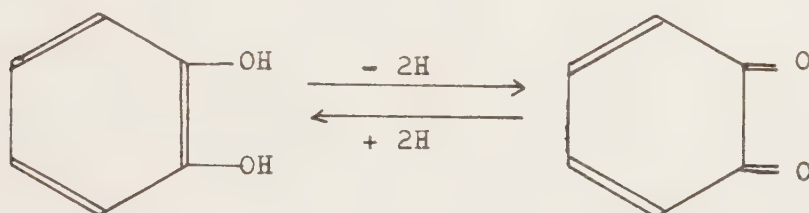


FIGURE N° 1

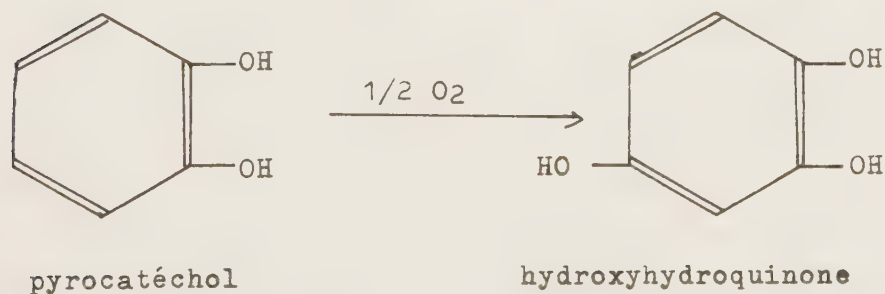
Le pyrocatéchol produit serait, selon EVANS (98), partiellement sous forme d'orthobenzoquinone en équilibre avec le pyrocatéchol.



Les différentes voies possibles de formation du pyrocatéchol sont résumées par la figure n° 1.

II.3.1.1.3. Formation des triphénols :

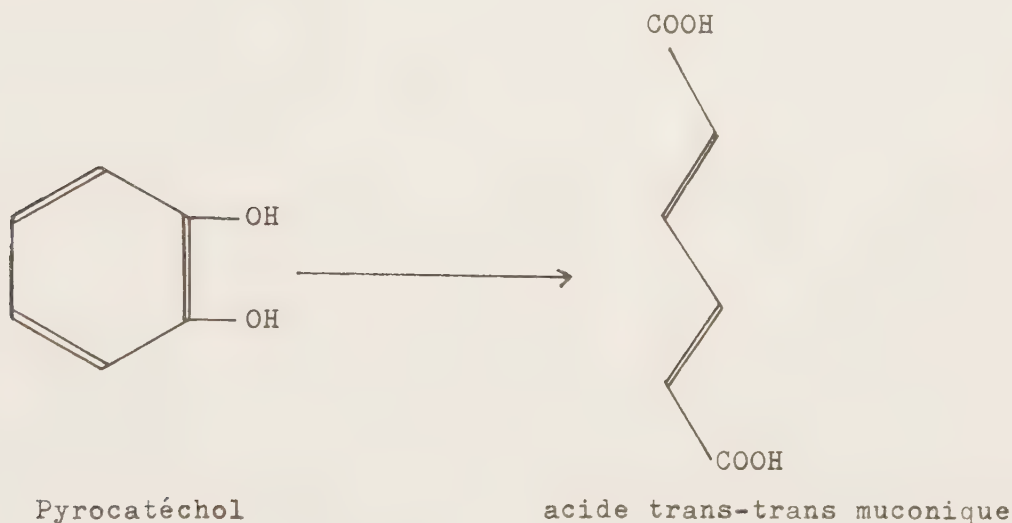
Des diphénoles produits, seul le pyrocatéchol subit une nouvelle oxydation nucléaire pour former un triphénol, l'hydroxyhydroquinone qui est le dernier phénol du métabolisme benzénique.



II.3.1.1.4. Formation de l'acide muconique et du gaz carbonique :

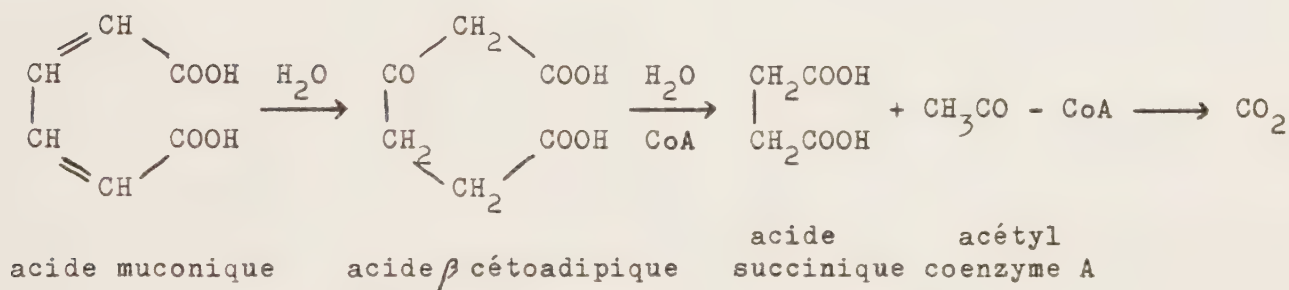
Une oxydation plus poussée du pyrocatéchol provoque l'ouverture du noyau benzénique et la formation de l'acide

muconique. La réaction est catalysée par une pyrocatechase isolée par HAYAISHI et Coll. (155 - 156) et EVANS et Coll. (100). L'acide muconique issu du benzène est retrouvé chez l'homme, les animaux, les végétaux (84) et les micro-organismes (214). Cependant, chez ces derniers, c'est la forme cis-cis qui est produite alors que chez l'homme et les animaux, c'est la forme trans-trans qui est retrouvée dans les urines (230 - 241 - 356).



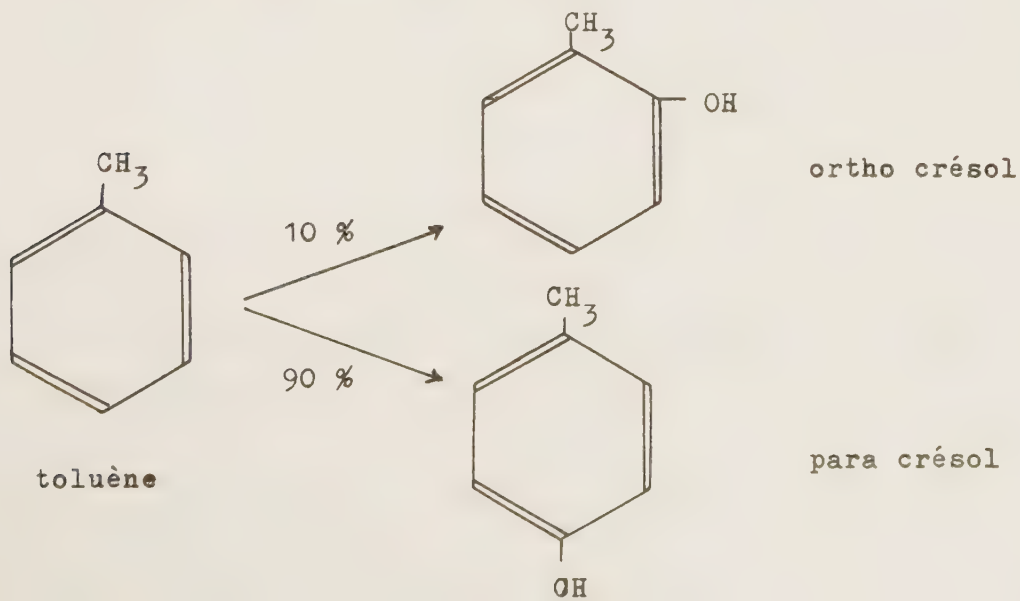
L'acide cis-cis muconique étant le composé obtenu in vitro par oxydation chimique du benzène, DRUMMOND et FINAR (83) ont émis l'hypothèse que c'était le composé formé in vivo qui ensuite se transformerait en forme trans-trans. Cette hypothèse a été infirmée par PARKE et WILLIAMS (258) pour qui l'isomère trans-trans de l'acide muconique est produit directement sans passage par la forme cis-cis. Ils confirment ainsi les travaux de BERNHARD et GRESSLY (34 - 35). Une partie de l'acide muconique formé est brûlée par l'organisme. Ceci a été constaté par JAFFE, et confirmé par BERNHARD et GRESSLY. L'acide muconique hydraté en présence de coenzyme A

produit l'acétyl coenzyme A et l'acide succinique (214), constituants du métabolisme intermédiaire, où ils sont métabolisés avec production d'anhydride carbonique. Ceci a été prouvé par PARKE et WILLIAMS (259) qui, employant du benzène marqué au ^{14}C , retrouvent dans l'air expiré du gaz carbonique marqué au ^{14}C .



II.3.1.2. Toluène :

L'oxydation nucléaire en crésols est observée pour de grandes doses de toluène (270 - 101). Dans ce cas, si les trois crésols peuvent se former d'après LAHAM (199, 200), BARKE et SCHELIN (16), chez le rat, n'ont caractérisé que les isomères ortho et para avec une prédominance de 90 % pour le para crésol.



Pour BRAY et Coll. (44), l'oxydation nucléaire ne se poursuit pas pour former des composés di-phénoliques comme dans le cas du benzène. FRIDLYAND, en 1970 (356), signale que chez le rat et le cobaye, se produit une dé-méthylation avec formation de phénol.

II.3.1.3. Xylènes :

L'oxydation nucléaire des trois isomères du xylène est, comme pour le toluène, une voie secondaire du métabolisme. Selon l'isomère, 2 % à 6 % des xylènes sont oxydés en xylénols (43). Selon FABRE et Coll. (111 - 112), BAKKE et Coll. (16) et LAHAM (199 - 200), les xylénols formés sont les suivants, à partir de :

- l'ortho xylène : les 2-3 et 3-4 xylénols
- le méta xylène : les 2-4, 3-5 et 2-6 xylénols
- le para xylène : le 2-5 xylénol.

(voir figure n° 2).

Comme dans le cas des crésols, l'oxydation nucléaire ne se poursuit pas sauf chez les micro-organismes qui, à partir du méta et du para xylène, après déméthylation partielle ou totale, produisent du pyro-catéchol et du méthyl pyrocatéchol (73). La déméthylation peut aussi se produire sans autre oxydation conduisant alors au phénol (123).

II.3.2. Oxydation de la chaîne latérale :

C'est la voie principale de métabolisme pour le toluène et les xylènes.

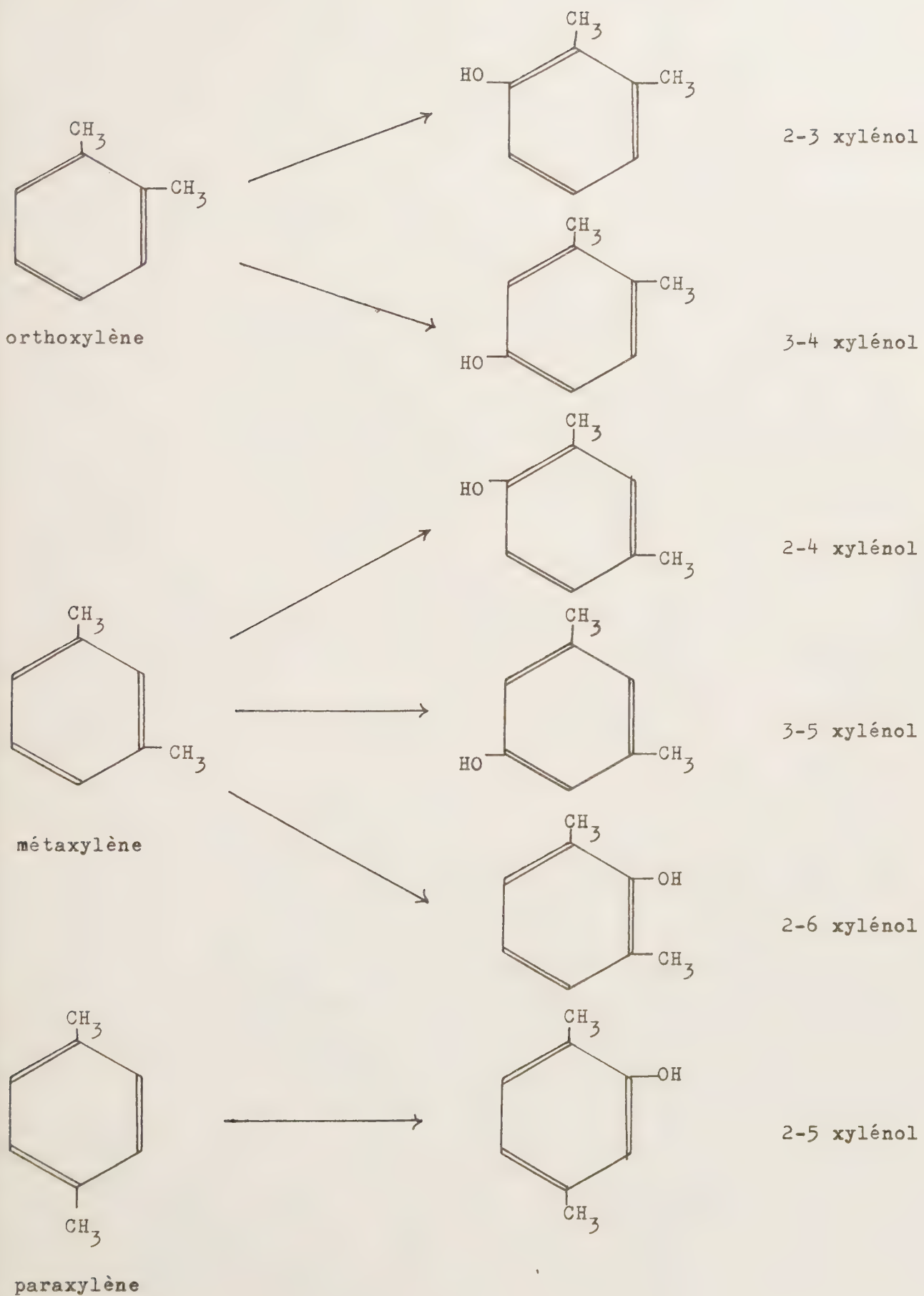
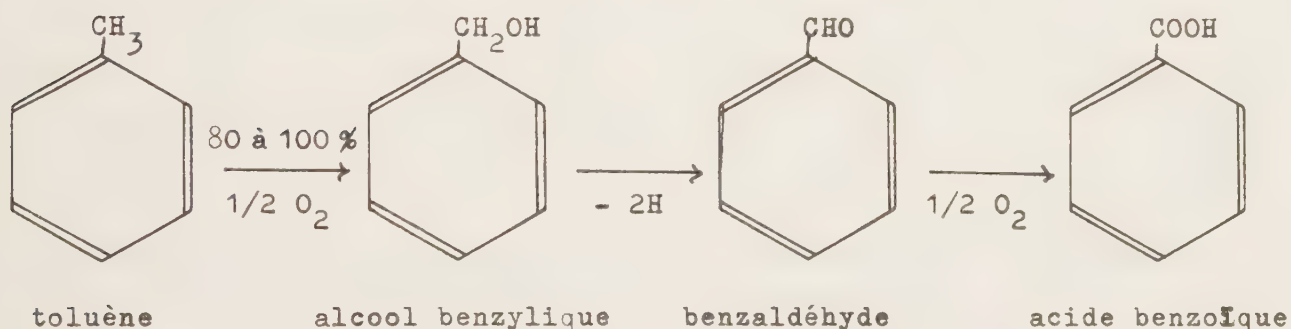


FIGURE N° 2

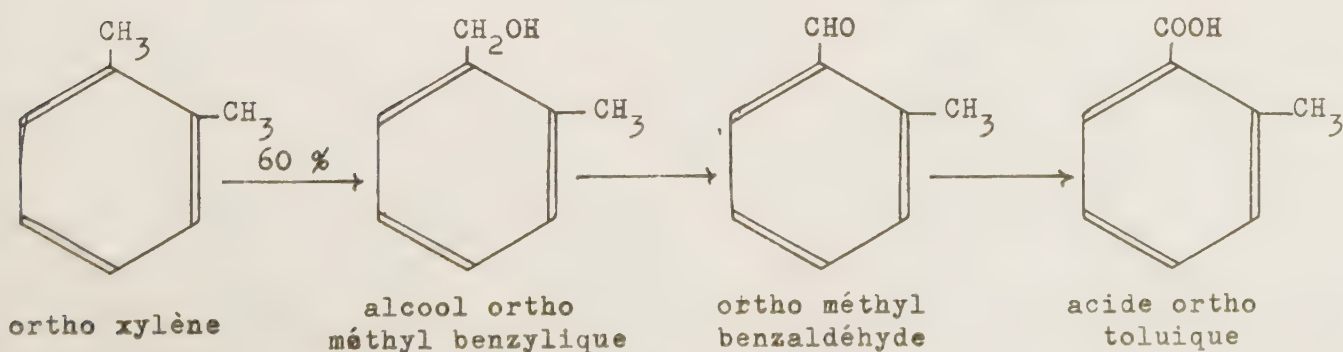
II.3.2.1. Toluène :

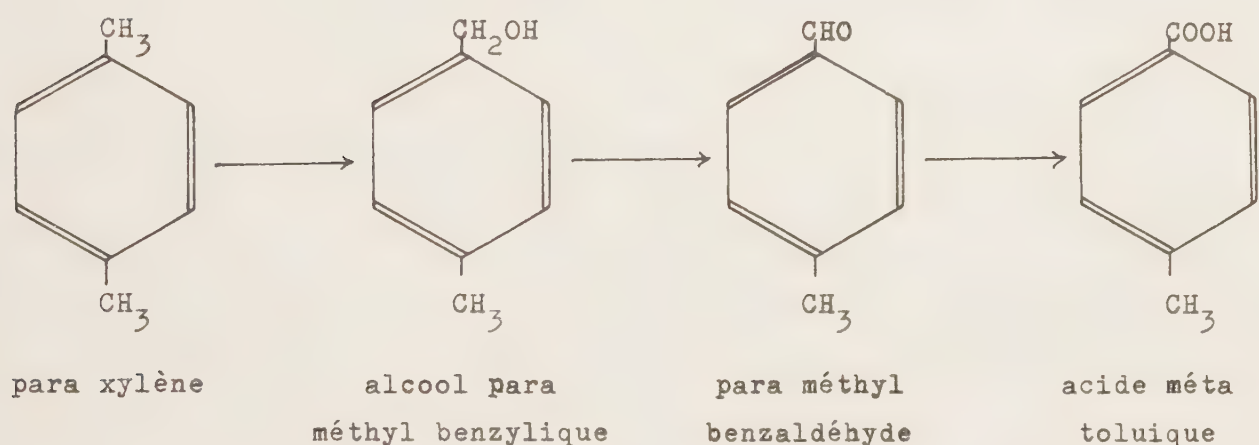
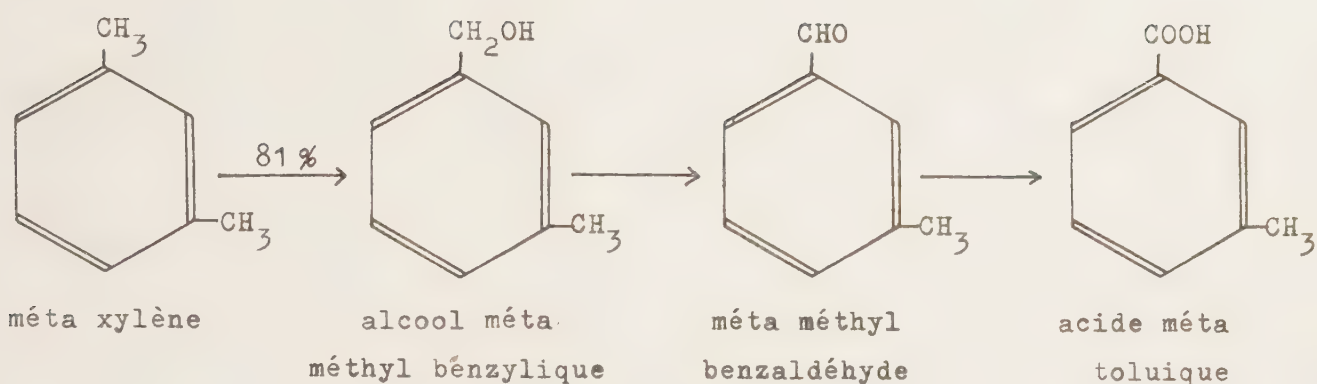
80 à 100 % du toluène est métabolisé par oxydation du groupement méthyl porté par le noyau benzénique (110 - 57). Cette oxydation s'effectue jusqu'à oxydation complète du groupement méthyl en fonction acide, formant l'acide benzoïque après les intermédiaires alcool et aldéhyde correspondants. Ce mécanisme a été décrit par KITAGAWA (182) et NOSAKA et Coll. (247).



II.3.2.2. Xylènes :

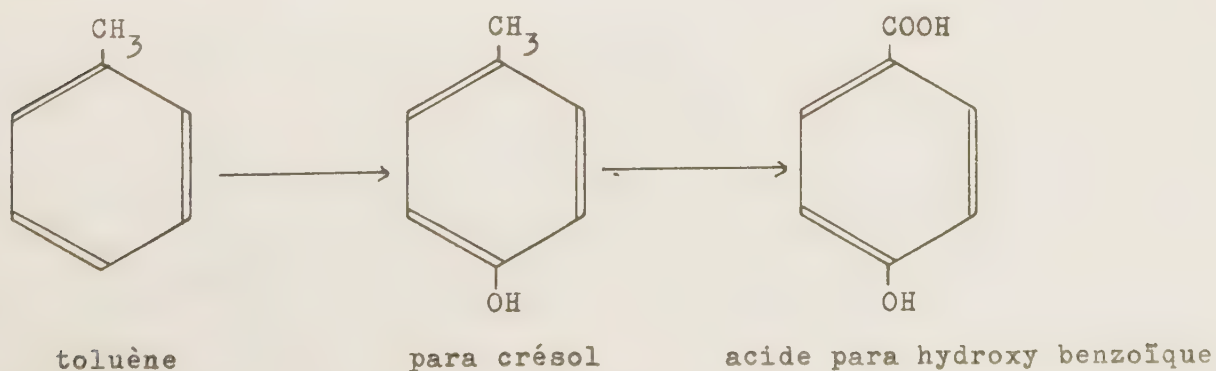
Par le même processus que celui décrit pour le toluène, les xylènes sont oxydés sur la chaîne latérale, mais un seul radical méthyl subit l'oxydation (195). La position du radical méthyl non oxydé modifie la quantité de l'isomère oxydé. Elle est de 60 % pour l'ortho, 81 % pour le méta et 88 % pour le para (43). Les acides aromatiques produits sont les acides toluïques correspondants, ainsi que l'alcool et l'aldéhyde intermédiaires.

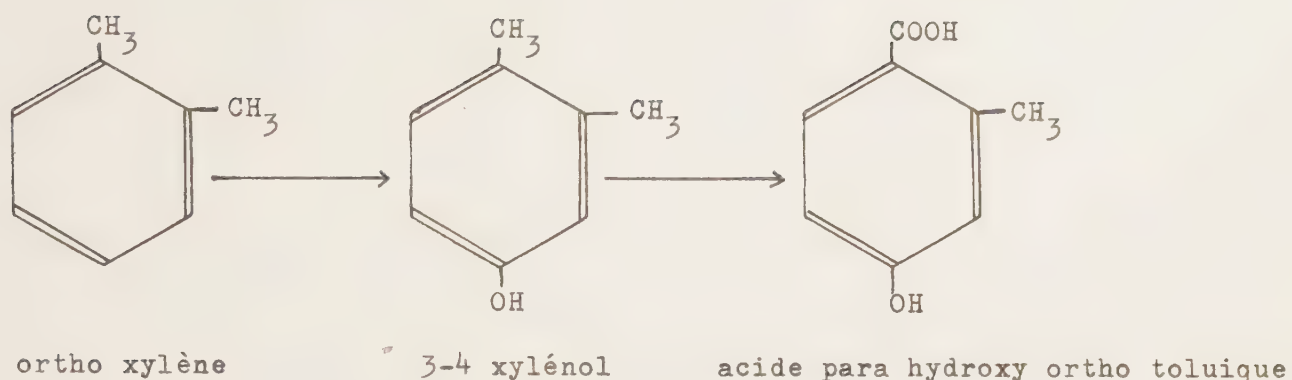




II.3.3. La double oxydation :

L'oxydation peut porter à la fois sur le noyau et sur la chaîne latérale. Ceci a été mis en évidence pour le toluène chez le lapin (44) et pour l'ortho-xylène chez le cobaye (386). Il se forme respectivement de l'acide para^{hydroxy}benzoïque et de l'acide para hydroxy ortho toluïque, après formation du phénol correspondant :





C'est une voie mineure, non retrouvée chez l'homme.

II.4. FACTEURS INFLUANT SUR L'OXYDATION :

En plus de l'espèce chez qui est effectuée l'étude du métabolisme, facteur introduisant des différences spécifiques (357), de nombreux facteurs influent sur l'oxydation des composés benzéniques. Certains favorisent l'oxydation ; d'autres, plus nombreux, la diminuent ou l'inhibent totalement.

II.4.1. Facteurs favorisants :

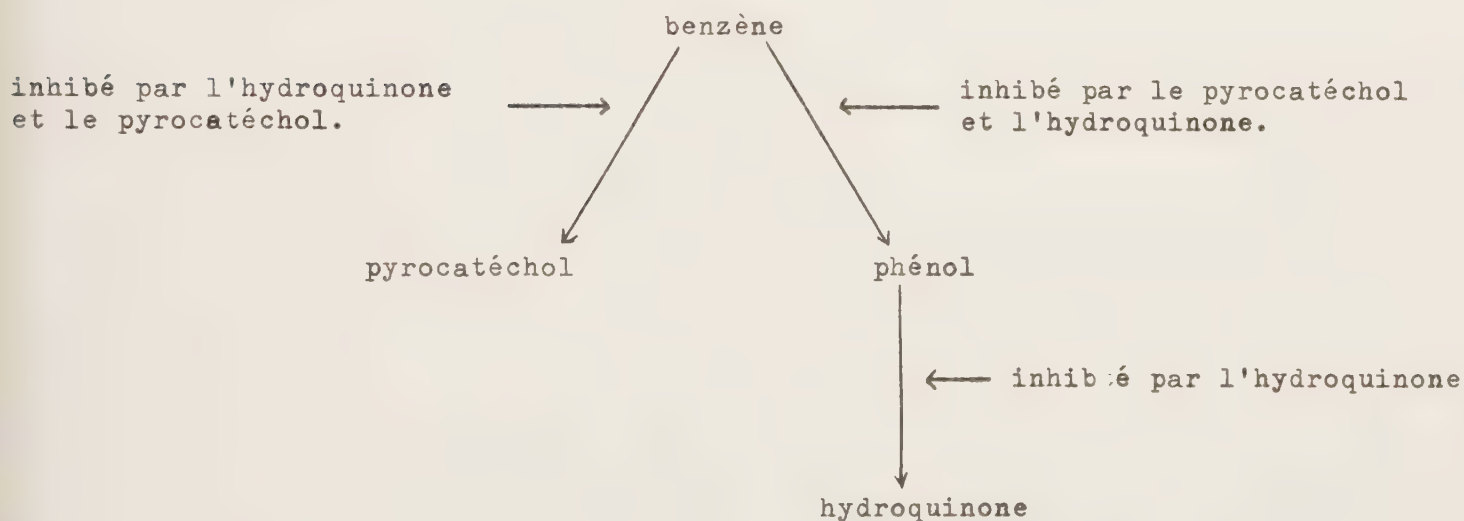
La synthèse et l'action du cytochrome P 450 et de la cytochrome C réductase sont augmentées en présence de certains composés dont le plus important est le phénobarbital (324). A un degré moindre, certains hydrocarbures aromatiques et des phénothiazines ont la même action. D'autre part, un prétraitement au benzène en petite quantité, stimule chez le lapin le métabolisme du benzène lors d'une exposition ultérieure (63 - 324).

II.4.2. Facteurs diminuants ou inhibants :

De nombreux produits diminuent ou inhibent complètement l'oxydation. Les plus connus sont le SKF 525A (65) qui est le chlorhydrate de β diéthyl amino éthyl diphenyl propylacétate, et des composés soufrés,

méthionine, cystéine, cystamine (4).

Pour le benzène, certains métabolites formés inhibent, à partir d'un certain taux, leur propre formation ultérieure ; c'est le cas des diphénols qui bloquent momentanément leur formation et celle du phénol, suivant le processus ci-dessous, mis en évidence par SATO et Coll. (301) :



III. BIOCONJUGAISON DES METABOLITES :

Avant d'être éliminés, 95 % des métabolites des hydrocarbures benzéniques subissent une conjugaison (42 - 48 - 75 - 275 - 295), véritable phase de détoxication par blocage de l'oxydation (134 - 60). Selon FABRE (104 - 106), le siège principal de la conjugaison est le foie où elle est maximale, puis elle décroît dans les reins, le coeur, la rate, le poumon et le cerveau. De plus, il met en évidence que la conjugaison est catalysée par des enzymes.

III. 1. LES MECANISMES DE CONJUGAISON :

Trois composés entrent dans la conjugaison des métabolites. Ce sont :

- l'ion sulfate,
- l'acide glucuronique,
- le glycocolle.

III.1.1. La sulfoconjugaison :

En 1955, DE MEHIO et Coll. (77), trouvent que la synthèse des esters sulfate s'effectue en présence de deux enzymes :

- un enzyme "activateur", responsable de la formation d'un sulfate actif intermédiaire.
- un enzyme "transporteur", qui catalyse le passage du sulfate de l'intermédiaire au substrat.

Deux ans plus tard, ROBBINS et LIPMANN (289) identifient la forme active intermédiaire du sulfate comme étant l'adénosine 3' phosphate 5' phosphosulfate (APPS). Ce dernier est synthétisé en deux étapes par des préparations de levure ou des homogénéisats de foie mis en présence d'adénosine triphosphate (ATP), d'ions SO_4^{--} et Mg^{++} (290 - 18 - 312 - 388).

La première étape comporte l'action réversible d'une adénosine triphosphate sulfurylase qui catalyse la formation de l'adénosine 5' sulfophosphate (ASMP) avec libération de pyrophosphate (PP). Cette étape est suivie d'une phosphorylation non réversible de l'ASMP en présence d'ATP et d'une adénosine 3' phosphate 5' sulfophosphokinase spécifique. Ces réactions sont activées par les ions sélénétate et inhibées par les ions

béryllium. Le sulfate est ensuite transféré de l'intermédiaire actif sur un substrat phénolique en présence de la phénolsulfokinase extraite du foie de lapin dès 1957, par GREGORY et Coll. (147) puis par SPENCER (326) et MAC EVOY et Coll. (216). Cet enzyme n'est pas le même que celui qui estérifie la tyrosine en thyrosine sulfate (313), mais il est extrait du ~~foie~~ **foie** de lapin dans les mêmes conditions que l'enzyme "hydroxylant" le ~~banzène~~ **benzène** (154) (Figure n° 3).

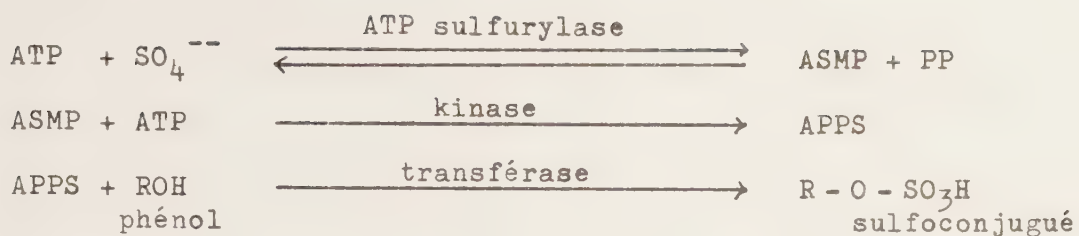
III.1.2. La glucurono conjugaison :

L'acide D glucuronique est formé dans le foie (158) à partir du D glucose (47). Le glucose, après phosphorylation en glucose 1 phosphate (G_1P), s'unit à l'uridine diphosphate (UDP) pour former l'uridine diphosphoglucose (UDPG). Ce dernier est déshydrogéné par une déshydrogénase à NAD, produisant ainsi l'acide uridine diphosphoglucuronique (UDPGA) qui, sous l'action de l'UDP glucuronyl transférase (71 - 87), cède l'acide glucuronique à un substrat (figure n° 3).

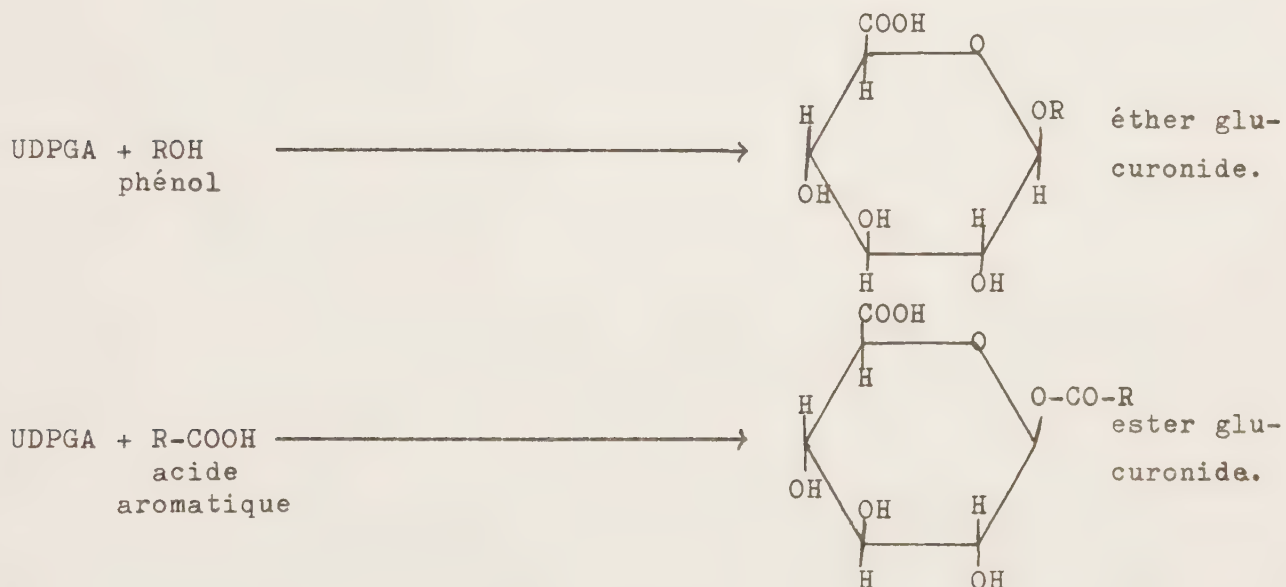
III.1.3. La glycyll conjugaison :

La conjugaison avec le glyocolle (acide α amino acétique) (gly) s'effectue, pour les acides aromatiques considérés, sous l'influence d'un enzyme, l'hippuricase (278) en présence d'ATP (40) et de coenzyme A (CoA) qui active le substrat (58) (figure n° 3).

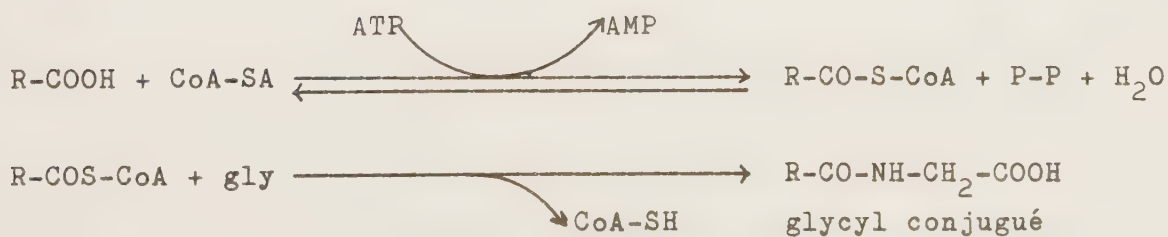
Le taux de glyocolle utilisable immédiatement pour la conjugaison est d'environ 100 mg/100 grammes de poids corporel (7). En présence d'une haute dose d'acide



SULFO CONJUGAISON



GLUCURONO CONJUGAISON



GLYCYL CONJUGAISON

aromatique, cette quantité de glycolle est insuffisante. Le surplus nécessaire provient alors du métabolisme protéique dans les tissus (288).

III.2. APPLICATION AUX METABOLITES :

Des composés formés oxydation, les phénols subissent une sulfo et une glucurono conjugaison (133 - 196 - 243 - 341) sur la fonction hydroxyl, tandis que les acides aromatiques sont glycyl et glucurono conjugués (276 - 277) sur la fonction acide.

III.2.1. Phénols :

Majoritaire pour le phénol, la sulfo-conjugaison diminue avec les autres phénols pour lesquels la glucurono conjugaison devient prépondérante.

Pour les monophénols, la fraction sulfoconjuguée passe de 50 à 80 % pour le phénol (60 - 260 - 285) à 10 à 30 % pour les crésols (44 - 174 - 385) et n'est plus que de 10 à 15 % avec les xylénols (45). Une partie, importante pour les xylénols, environ 20 %, ne subit pas de conjugaison.

Les di et triphénols sont glucurono-conjugués de 40 à 50 % (132 - 257) et sulfo-conjugués pour 30 %, le reste demeurant libre.

Les pourcentages respectifs des deux conjugaisons sont soumis à de nombreuses variations, surtout dans le sens d'une diminution de la sulfo-conjugaison. Dans ce cas, elle est remplacée par la glucurono-conjugaison (65) qui peut former jusqu'à 100 % de la fraction conjuguée (76) en cas de déficience de la sulfo-conjugaison.

III. 2.2. Acides aromatiques :

L'acide benzoïque et les acides ortho, méta et para toluiques sont principalement conjugués avec le glyco-colle pour former respectivement les acides hippuriques et méthyl hippuriques (276 - 277). C'est la conjugaison hippurique que subissent 70 à 100 % des acides formés après une faible exposition (49 - 95 - 184), le reste étant glucurono conjugué ; ce mode de conjugaison devient prépondérant en présence de fortes doses inhalées (46 - 186). Chez les oiseaux, la conjugaison hippurique n'existant pas, les acides aromatiques sont conjugués avec l'ornithine qui remplace le glyco-colle pour former les acides ornithuriques.

III.3. FACTEURS INFLUANT SUR LA CONJUGAISON :

Les trois conjugaisons considérées sont diminuées en cas de déficience hépatique (397) due à une hépatite virale, à l'âge ou aux produits hépato-toxiques. L'âge a une certaine importance puisque, après 55 ans, la conjugaison diminue de 20 % (144). Mais dans l'industrie, les hépato-toxiques employés, solvants chlorés, (131), ou l'alcoolisme (59), sont particulièrement néfastes puisqu'ils diminuent la conjugaison jusqu'à 50 %. Ceci serait dû à une diminution de l'ATP hépatique et du coenzyme A, dans le cas de la glycyl conjugaison.

- La sulfo-conjugaison peut être inhibée par les composés thiols et le glutathion qui, à la concentration de 3 mM, diminuent l'activité de la phénolsulfokinase de 50 % (217 - 371). D'autre part, cette conjugaison est influencée par la position d'un substituant si celui-ci est en ortho ou méta, mais seulement dans le cas d'un radical acide ou basique (385).

- la glucurono-conjugaison est diminuée tout d'abord par les facteurs inhibant la synthèse de l'acide glucuronique à partir du glucose. C'est le cas lors d'une diminution du taux de l'insuline (233). Une adrénalotectomie (232) ou une exposition aux rayons X (254) agissent dans le même sens. La glucuronoconjugaison est favorisée par certaines drogues telles que la tolbutamide, la glucuronamide, ou la digitonine (153).

- La glycy-l-conjugaison est favorisée par un apport accru de glyocolle ou de protéines riches en glyocolle (1). La position du substituant influe aussi sur la conjugaison, dans les mêmes conditions que pour la sulfo-conjugaison (279).

IV. ELIMINATION DES METABOLITES :

Les composés oxydés formés, libres ou après conjugaison, sont éliminés dans les urines ou par la bile (3) dans les fécès. Dans le cas du benzène, c'est le phénol qui est éliminé le premier (275), quelques heures après l'exposition. Les diphénols et l'hydroxyhydroquinone n'apparaissent dans les urines que deux ou trois jours après. L'acide muconique a la particularité d'être retrouvé dans les urines totalement à l'état libre, ne subissant aucune conjugaison. En ce qui concerne le toluène et les xylènes, les métabolites sont retrouvés dans les urines quelques heures après exposition.

Ainsi, chez l'homme, après exposition aux benzène, toluène ou xylènes, les métabolites présents dans les urines seront :

- phénol, pyrocatéchol, hydroquinone, hydroxyhydroquinone, sous forme libre ou conjuguée et l'acide muconique libre, dans le cas du benzène,
- para crésol, libre ou conjugué, acides hippurique et benzoyl glucuronique, pour le toluène,
- 3-4 et 2-3, 2-4, 3-5 et 2-6, 2-5 xylénols libres ou conjugués, et les acides ortho, méta, para toluïques, pour les ortho, méta et para xylènes.

Les métabolismes des trois hydrocarbures benzéniques considérés sont résumés dans les figures n°s 4, 5, 6.

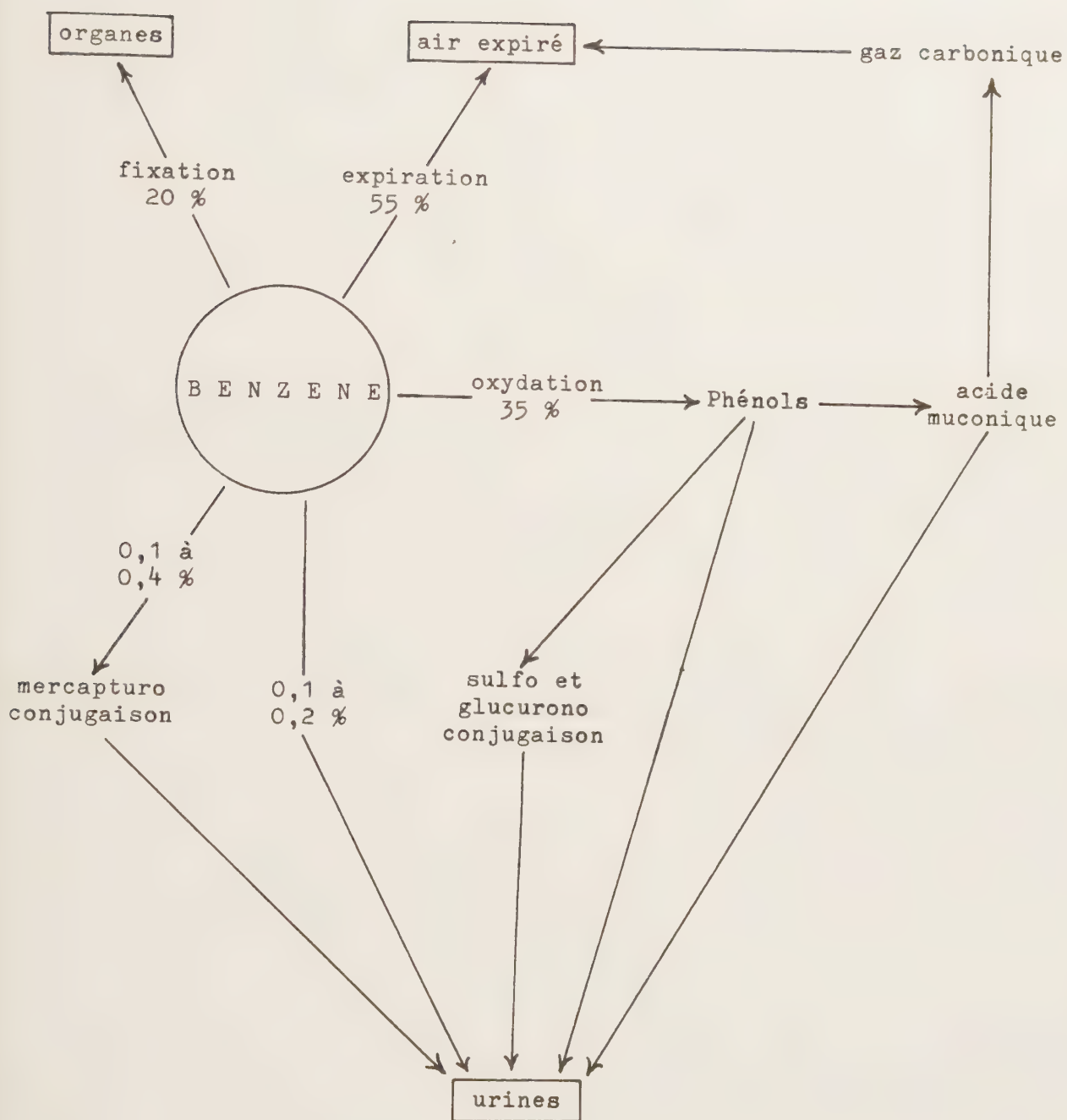


FIGURE N° 4 : METABOLISME DU BENZENE

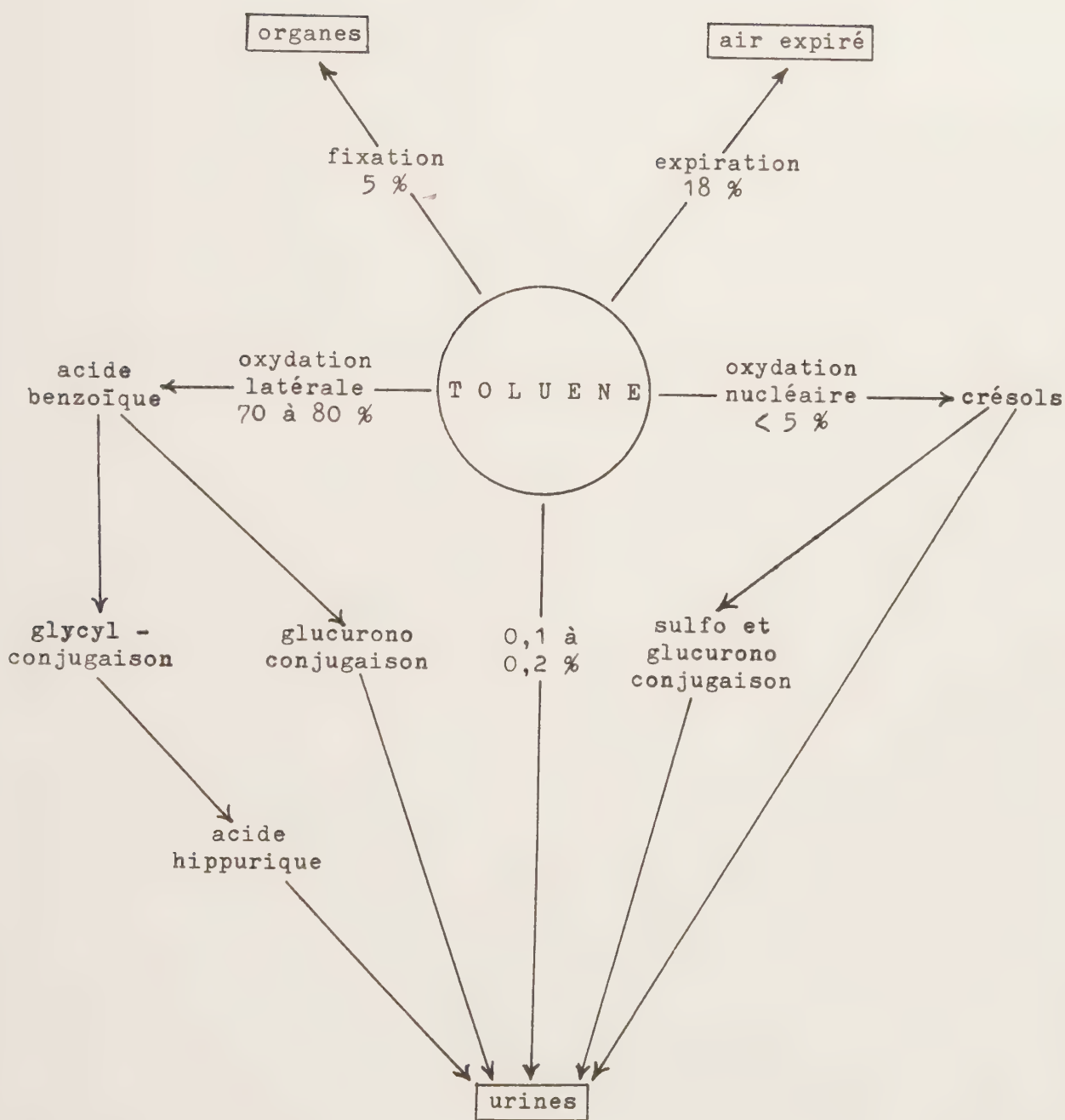


FIGURE N° 5 : METABOLISME DU TOLUENE

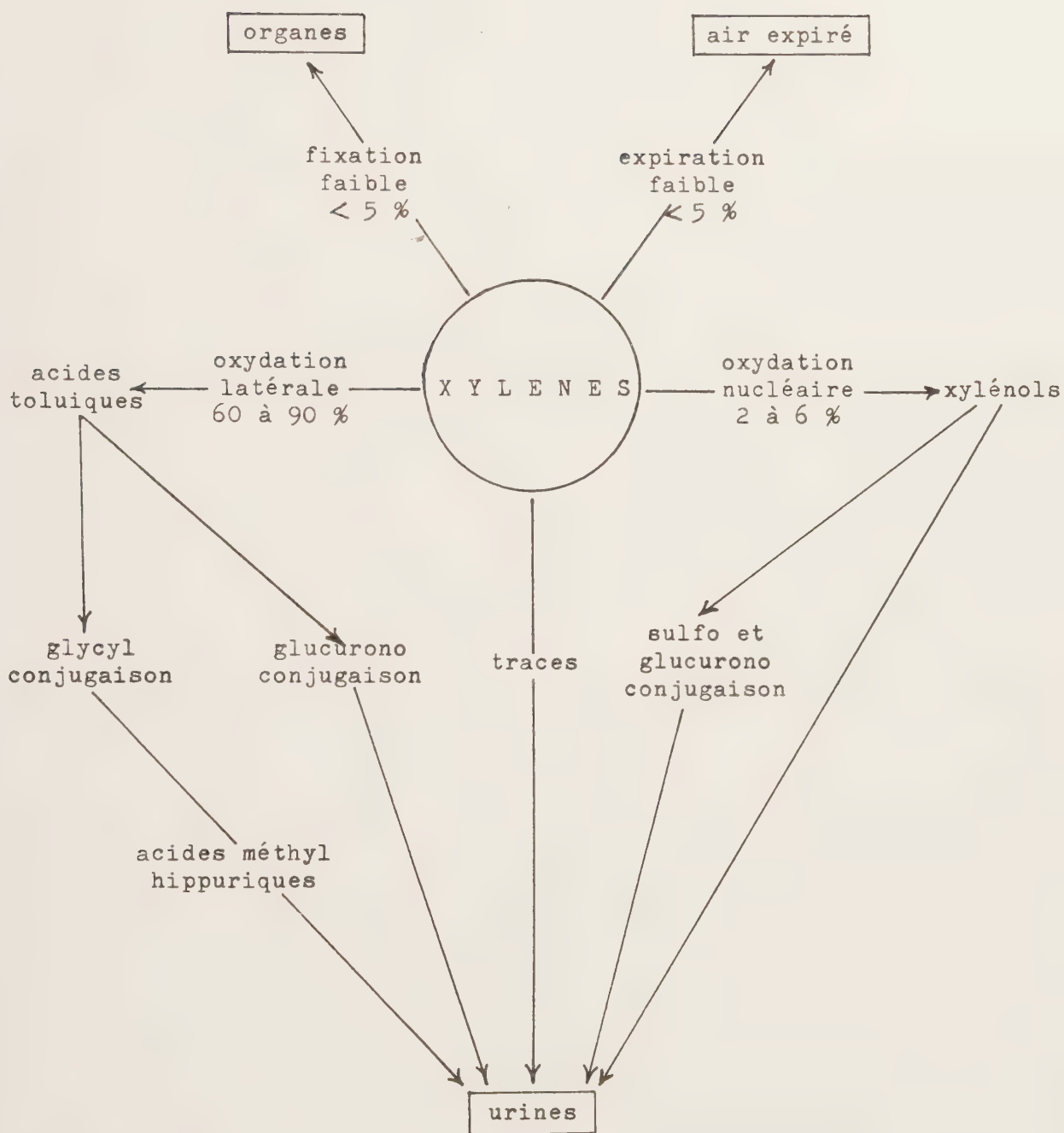


FIGURE N° 6 : METABOLISME DES XYLENES

- CHAPITRE DEUXIEME -

DOSAGES DES METABOLITES URINAIRES
DU BENZENE, DU TOLUENE ET DES XYLENES,
UTILISES EN TANT QUE TESTS D'EXPOSITIONS.

=====

Peu de métabolites du benzène, du toluène et des xylènes sont dosés systématiquement dans les urines des personnes exposées. Dans l'industrie, le taux de ces métabolites est déterminé pour suivre les expositions répétées de façon à les interrompre, le cas échéant, avant l'apparition des troubles cliniques de l'intoxication chronique. Ces dosages constituent les tests d'exposition quand le toxique manipulé est connu, plus que la caractérisation indirecte d'un toxique inconnu. Dans ce dernier cas, les tests ne peuvent constituer qu'une orientation de recherche du toxique.

Pour suivre l'exposition aux hydrocarbures benzéniques considérés, trois tests sont utilisés (224 - 348) :

- le dosage de l'acide hippurique,
- le test aux sulfates,
- le dosage des phénols.

Les composés dosés étant présents à l'état normal dans les urines, c'est l'augmentation de leur taux qui est en cause. L'acide hippurique est dosé lors des expositions au toluène, mais, selon la technique utilisée, les acides méthyl hippuriques sont dosés simultanément, ce qui permet de suivre l'exposition aux xylènes. Le test aux sulfates et le dosage des phénols sont employés comme tests d'exposition au benzène.

I. L'ACIDE HIPPURIQUE :

Produit résultant du métabolisme du toluène, l'acide hippurique est souvent dosé en même temps que les acides méthyl hippuriques, métabolites des xylènes (256), peu de méthodes les séparant

avant dosage.

I.1. LES METHODES DE DOSAGE :

Les dosages urinaires s'effectuent après extraction en milieu acide par un solvant approprié. Les plus employés sont :

- l'acétate d'éthyle (323),
- le mélange éthanol - éther (256),
- le mélange alcool isopropylique - éther diéthylique (22),
- l'éther diéthylique (148).

L'acide hippurique est ensuite dosé dans la phase organique par différentes méthodes :

I.1.1. Gravimétrie :

Par entraînement à la vapeur d'eau, suivi d'une évaporation (70) ou d'une cristallisation (124 - 325), on obtient l'acide hippurique cristallisé qui est pesé après lavage et séchage (323).

I.1.2. Par l'intermédiaire du dosage du glycocolle :

Dans ce cas, l'extraction est effectuée en présence de sulfate acide de sodium, pour ne pas extraire l'urée. Après évaporation de la phase organique, on mesure le dégagement d'azote par la méthode à l'hypobromite sodique de KJELDALH (148 - 390). QUICK préfère effectuer une hydrolyse libérant ainsi le glycocolle dosé par formol - titration (276).

I.1.3. Titrimétrie :

Certaines méthodes titrimétriques s'effectuent non

- 86 -

pas après extraction mais après précipitation de l'acide hippurique par l'acide sulfurique 10N, après chauffage de l'urine en milieu acétique - chlorure de sodium. Le précipité obtenu est lavé puis dissout dans l'eau chaude. La solution aqueuse est titrée par la soude en présence de phénolphthaléine (191 - 381), ou mieux, par le sulfate ferreux en présence de chromazural S (372), ou le chlorure de zinc, en présence d'orangé de xylénol (193) comme indicateur.

FOLIN et Coll. (117), puis KINGSBURY et Coll. (181), préconisent une extraction chloroformique après minéralisation de l'urine, puis une titrimétrie de la phase chloroformique par l'éthylate de sodium en présence de phénolphthaléine. Cette méthode a été modifiée par JASERISKI et Coll. (171) qui emploient la potentiométrie comme indicateur.

I.1.4. Spectrométrie U.V. :

A partir des extraits, en employant les mélanges alcool - éther, PAGNOTTO et LIEBERMAN (256), puis BARDODEJ (22), préconisent une spectrométrie directe dans l'ultra-violet à 230 nm, l'acide hippurique présentant un maximum d'absorption à cette longueur d'onde. RIEDER (286) préfère une mesure de l'absorption à 220 et 246 nm, ce qui permet de doser l'acide hippurique en présence d'acide benzoïque, en appliquant la méthode de différentiation des compositions binaires développée en spectrométrie. ELLIOT (90) effectue une séparation préalable par passage sur résine échangeuse d'ions et SINHA et Coll. (318) par chromatographie d'exclusion - diffusion, sur Séphadex G 10.

L'intensité de la coloration est mesurée entre 460 et 470 nm.

MIKULSKI et WIGLUSZ (225) appliquent la réaction directement sur le résidu, après évaporation. Ils sensibilisent la coloration en l'effectuant en présence d'ions Fe^{+++} . Plus souvent, les auteurs préfèrent une séparation préalable par chromatographie.

I.1.5.1.1. Chromatographie sur papier :

La phase organique est concentrée puis déposée sur papier. Différents solvants sont employés :

- benzène - acide acétique - eau (1-1-2), par EL MASRY et coll. (93)
- toluène - acide acétique - eau (100-50-2 à 3), par OGATA et Coll. (251)
- butanol - acide acétique - eau (4-1-1), par GAFFNEY (129).

Les spots sont révélés par pulvérisation de PDAB et celui correspondant à l'acide hippurique est extrait par le méthanol, puis colorimétré.

D'après OGATA, les résultats ne sont pas reproductibles et les acides hippuriques sont mal séparés.

I.1.5.1.2. Chromatographie sur couche mince :

Elle s'effectue sur un support de silicagel, souvent additionné de cellulose MN. OGATA emploie le même solvant que celui qu'il utilise en chromatographie sur papier. TEUCHY et VAN SUMERE (349) emploient un solvant analogue, mais en remplaçant l'acide acétique par le formiate d'éthyle (2-10-1). La fin de l'analyse est effectuée comme pour la chromatographie sur papier.

Lachromatographie sur couche mince est reproductible, rapide et de plus, elle permet de bien séparer les acides hippurique et méthyl hippuriques.

La réaction de coloration au PDAB est sensible à $4 \mu\text{g/ml}$. Elle permet le dosage des acides hippurique et méthyl hippuriques qui cependant, à 460 ou 470 nm, ont des coefficients d'extinction molaire différents de $1,5 \times 10^4$ pour l'acide hippurique et $1,4 \times 10^4$ pour les acides méthyl hippuriques (251).

I.1.5.2. Colorimétrie au chlorure de benzène sulfonyle :

Les acides hippuriques se condensent avec le chlorure de benzène sulfonyle en milieu pyridinique, pour former une azolactone proche de celle formée avec le PDAB. La coloration est photométrée à 460 nm.

La réaction est effectuée dans les mêmes conditions que celles vues lors de l'utilisation du PDAB. Elle est employée par UMBERGER (367) et OGATA et Coll. (251). Elle est un peu moins sensible que la précédente, $20 \mu\text{g/ml}$.

D'autres méthodes colorimétriques sont utilisées, mais après hydrolyse libérant l'acide benzoïque. Ce dernier est transformé en acide amino benzoïque qui, diazoté, est couplé à un colorant puis photométre (80 - 378) ou oxydé en acide salicylique dosé par le réactif de MILLON (280).

I.1.6. Fluorimétrie :

L'acide hippurique en milieu sulfurique est fluorescent par excitation à 250 nm ; la fluorescence est mesurée

à 375 nm, par ELLMAN (92). Cette technique est applicable à 2 μ l d'urine ; elle est très sensible mais troublée par de nombreuses causes d'erreurs dues aux amino acides benzoylés (alanine, tyrosine), acide glutamique, acides benzoïque ou salicylurique.

I.1.7. La chromatographie en phase gazeuse :

Elle s'effectue après méthylation de l'acide hippurique à l'aide du diazométhane. Différentes phases stationnaires sont utilisées :

- silicone à 191°, par WILLIAMS et SWEELEY (334 - 383 - 384)
- silicone fluoré QF₁ à 5 %, sur chromosorb W1 silanisé à 170°, par JAMES (170) et SYBIL et Coll. (335)
- néopentyl glycol succinate (NPGS) à 3 % sur chromosorb W à 190°, par SEDIVEC et FLECK (311).

Sur les colonnes de silicone l'acide hexamercapturique est utilisé comme étalon interne, alors que c'est la phénacétine qui est utilisée sur le néopentyl glycol succinate.

Dans tous les cas, le détecteur est à ionisation de flamme et le gaz vecteur de l'azote.

La méthode semble sensible et précise mais n'est pas actuellement employée de manière courante.

I.2. LES RESULTATS OBTENUS :

L'acide hippurique est un constituant normal de l'urine. Il provient du métabolisme protéique, surtout de la phénylalanine (6),

mais l'acide benzoïque précurseur est amené principalement par l'alimentation, fruits et légumes. L'acide hippurique a été caractérisé dans les urines dès le siècle dernier par BUNGE et Coll. (53), puis SALKOWSKI (296 - 297).

I.2.1. Taux normaux urinaires :

Pour les auteurs européens ou américains, le taux moyen d'acide hippurique urinaire est de 0,80 g/litre, avec des variations extrêmes de 0,40 à 1,40 g/litre (164 - 225 - 383). Chez les japonais, le taux moyen n'est que voisin de 0,20 g/litre (249).

I.2.2. Augmentation par exposition au toluène :

L'acide hippurique urinaire augmente proportionnellement à la concentration de toluène dans l'air. Ceci a été mis en évidence sur l'homme par VON OETTINGEN et Coll. (377). OGATA et Coll. (249 - 250 - 252), reprenant l'expérience, trouvent une proportionnalité jusqu'à 200 p.p.m. de toluène dans l'air. A cette concentration chez les sujets japonais, le taux moyen d'acide hippurique urinaire est de 2,5 g/litre. Le taux, pour la même concentration, est plus élevé pour PAGNOTO (256), puisque variant de 3,5 à 7 g/litre, ou pour IKEDA (165), qui trouve une moyenne de 6 g/litre avec des taux extrêmes de 4 à 8,5 g/l, ceci avec la même technique qu'OGATA et sur des sujets japonais.

TEISSINGER et Coll. (263 - 345 - 346) ont trouvé des résultats proches de ceux d'IKEDA, prévoyant à la concentration de 200 p.p.m. un taux d'acide benzoïque variant de 2 à 5 grammes (1 g d'acide hippurique = 1,5 g d'acide benzoïque).

Tous ces résultats ont été obtenus par les méthodes spectrométriques en U.V. ou colorimétriques.

I.2.3. Augmentation par exposition aux xylènes :

Seuls OGATA et Coll. (252) ont dosé les acides méta et para hippuriques pour suivre une exposition aux méta et para xylènes. Ils ont employé les méthodes colorimétriques après chromatographie sur papier ou sur couche mince. Les résultats obtenus sont semblables à ceux concernant les dosages de l'acide hippurique après exposition au toluène.

I.2.4. Autres augmentations :

L'acide hippurique est le métabolite d'autres hydrocarbures benzéniques tels que l'éthyl benzène et le styrène (137), dont l'emploi augmente le taux urinaire d'acide hippurique. C'est aussi le métabolite de certaines drogues comme les amphétamines (91) mais surtout, une grosse consommation de fruits, prunes, pruneaux, airelles, ou de café (224), apporte de l'acide benzoïque éliminé sous forme d'acide hippurique.

II. LES SULFATES :

Comme les phénols sont éliminés en partie sous forme sulfoconjuguée faisant ainsi augmenter les sulfates organiques urinaires, le test aux sulfates fut longtemps employé pour suivre une exposition au benzène.

II.1. DOSAGE DES SULFATES URINAIRES :

Les sulfates urinaires sont précipités par un sel de baryum, chlorure ou chloranilate (150), ou par le chlorhydrate de benzdine, en milieu acide faible ou fort.

En milieu acide faible, les sulfates minéraux seuls précipitent, la précipitation des sulfates organiques exigeant une hydrolyse préalable par un acide fort. Dans ce cas, les sulfates sont précipités dans leur totalité et c'est par différence que s'obtiennent les sulfates organiques (116) :

$$\text{SO}_4^{--} \text{ organiques} = \text{SO}_4^{--} \text{ totaux} - \text{SO}_4^{--} \text{ minéraux.}$$

Les sulfates totaux sont précipités à chaud, en milieu chlorhydrique concentré (6N), selon SALKOWSKI (298). Pour les sulfates minéraux, BAUMANN (26) effectue la précipitation en milieu acétique et FOLIN (116) par l'acide chlorhydrique dilué. GERARDE (138) acidifie la totalité des urines par l'acide chlorhydrique 6N, puis en neutralise la moitié par le carbonate acide de sodium, pour ne précipiter que les sulfates minéraux. Le précipité obtenu est déterminé par différentes méthodes :

II.1.1. Gravimétrie :

Ce fut la première méthode employée par BAUMANN et SALKOWSKI. Après séparation, lavage et séchage, le précipité est pesé. ELKINS (88) calcine le précipité avant pesée.

II.1.2. Néphélométrie - turbidimétrie :

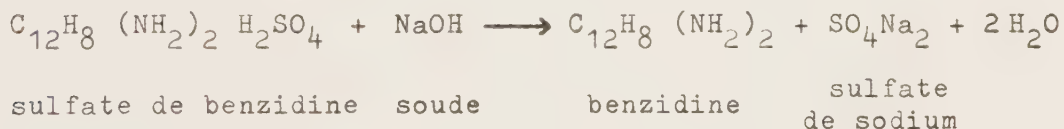
Le précipité de sulfate de baryum obtenu est mis en suspension, soit directement, soit après reprécipitation dans différents solvants (358), en présence d'un

fixateur. Les fixateurs employés sont des colloïdes (220 - 314), surtout la gélatine qui contient des sulfates minéraux utilisés comme étalon interne (136) ou simplement du chlorure de baryum en poudre (237 - 362). La suspension ainsi stabilisée est ensuite mesurée par turbidimétrie.

Cette méthode de dosage est faussée en présence d'héparine ou de thiosulfate (33).

II.1.3. Titrimétrie :

Après séparation et lavage à l'acétone ou l'éthanol, le sulfate de benzidine est titré à chaud par la soude en présence de phénol phtaléine ou de rouge de phénol. La réaction du dosage est la suivante :



Cette acidimétrie directe du sulfate de benzidine est rendue possible par le fait que la benzidine libérée est une base très faible non alcaline avec les indicateurs utilisés (183). FABRE (105) effectue le dosage après hydrolyse acide.

II.1.4. Colorimétrie :

Le sulfate de benzidine, séparé et lavé, est dissout dans une solution aqueuse de borate de sodium en présence de soude qui libère la benzidine. Cette dernière est dosée par colorimétrie après copulation avec le β naphtoquinone 4 sulfonate de sodium (183 - 206).

II.1.5. Complexométrie :

Le baryum du sulfate de baryum est dosé par LEWIS (270) par complexométrie en milieu ammoniacal. Un excès d'EDTA est titré par une solution de chlorure de magnésium, en présence de noir ériochrome T et de jaune de méthyl, comme indicateur.

II.2. RESULTATS :

II.2.1. Expression et taux normaux :

Les sulfates urinaires sont sous forme de sulfates minéraux et organiques dans le rapport de 9 à 1. Plutôt que d'exprimer la seule augmentation des sulfates organiques, on préfère suivre la variation du rapport entre les deux formes des sulfates exprimés en soufre (S). Selon le mode d'expression de ce rapport, les variations normales sont :

1.
$$\frac{S \text{ organique}}{S \text{ minéral}} = 0,05 \text{ à } 0,25.$$
2.
$$\frac{S \text{ minéral}}{S \text{ total}} = 0,80 \text{ à } 0,95.$$
3.
$$\frac{S \text{ des sulfoconjugués}}{S \text{ total}} = 0,05 \text{ à } 0,10.$$

Le soufre des sulfoconjugués étant le soufre des sulfates organiques.

Les variations seront dans le sens d'une augmentation pour rapports 1 et 3 et dans le sens d'une diminution pour le rapport 2.

II.2.2. Variations lors de l'exposition au benzène :

Dans ce cas, l'augmentation des sulfates organiques est en accord avec l'exposition déterminée au benzène, ainsi qu'avec les signes cliniques observés (166 - 172). L'augmentation observée est quantitativement en relation avec la sévérité et le temps de l'exposition. En effet, pour SCHRENK, YANT et Coll. (307 - 392), la diminution du rapport :

$$\frac{S \text{ minéral}}{S \text{ organique}}$$

est la même si l'exposé reste longtemps en présence d'une faible concentration en benzène, ou peu de temps en présence d'une forte concentration. TEISINGER et Coll. (344 - 348) estiment que le test reste normal pour une exposition inférieure à 25 p.p.m. et devient anormale, de manière significative, pour des concentration dépassant 50 p.p.m., concentration où l'augmentation des sulfates organiques est de 15 %. Ceci est en accord avec les résultats trouvés par FORSMAN et FRYKHOLM (120), mais pas avec ceux de ELKINS (89) pour qui ce chiffre de 15 % est obtenu dès 25 p.p.m. de benzène. Pour ce dernier, une exposition de 75 p.p.m. diminue les sulfates minéraux de 35 %.

II.2.3. Variations lors de l'exposition au toluène :

Le test aux sulfates ne varie pas lors de l'exposition au toluène, ou alors ne subit que des variations insignifiantes (25 - 377). Ainsi FABRE (109), effectuant le test lors d'un séjour en atmosphère de benzène et de toluène à la même concentration, trouve que le rapport

$$\frac{S \text{ des sulfoconjugués}}{S \text{ total}} \text{ passe de } 0,06 \text{ à } 0,22$$

en présence de benzène, et de 0,08 à 0,11 avec le toluène.

II.2.4. Variations lors de l'exposition aux xylènes :

Les résultats ne sont pas significatifs comme dans le cas du toluène.

II.2.5. Autres variations :

La sulfoconjugaison étant un moyen de détoxification important pour l'organisme, le test aux sulfates varie pour bien d'autres causes que l'exposition au benzène.

Les causes principales sont :

- la nourriture, surtout les crucifères (224),
- les médicaments soufrés comme les sulfamides (109),
- les affections hépatiques, rénales ou intestinales,
- l'exposition à d'autres solvants comme le cyclohexane et ses dérivés (364).

D'autre part, il faut noter une disproportion entre l'augmentation des sulfates organiques et le taux de phénol urinaire, ce dernier étant toujours plus bas (343).

Le test aux sulfates conserve malgré tout une certaine valeur s'il est effectué avant et après manipulation de benzène (347). Il est cependant de plus en plus abandonné au profit du test au phénol.

III. LES PHENOLS :

Les phénols étant éliminés dans les urines libres ou conjuguées, les techniques de dosage s'effectuent avant et après hydrolyse, suivie généralement d'une extraction par un solvant organique. Les phénols sont ensuite dosés dans leur ensemble ou séparément, selon la technique employée (2).

III.1. L'HYDROLYSE :

Elle est effectuée par des méthodes chimiques ou enzymatiques libérant les phénols de leur conjugaison.

III.1.1. Hydrolyse chimique :

L'urine est chauffée en présence d'un acide concentré. Les acides les plus employés sont les acides sulfurique (10 - 305 - 339), perchlorique (281 - 316), phosphorique (310) et chlorhydrique (204 - 221). L'hydrolyse est favorisée par la présence d'ions baryum qui, précipitant les acides libérés, déplacent l'équilibre de la réaction dans le sens de l'hydrolyse. D'après PORTEOUS et WILLIAMS (274), l'emploi d'acide sulfurique dilué ne libère pas les phénols de leur glucurono conjugaison, permettant ainsi de doser les deux fractions conjuguées séparément. BAKKE et SCHELINE (15), étudiant l'hydrolyse sulfurique, constatent une décarboxylation d'environ 2,5 % des acide - phénols présents dans l'urine, augmentant ainsi le taux des phénols urinaires.

III.1.2. Hydrolyse enzymatique :

Les urines à pH 5 sont mises en présence de suc

d'*Helix pomatia* à 37°, pendant 24 heures. Le suc contient une sulfatase et une β glucuronidase pouvant agir ensemble ou être séparées. C'est la méthode la plus sûre pour étudier les fractions phénoliques sulfo et glucurono conjuguées (15).

III.2. L'EXTRACTION :

Les phénols, avant et après hydrolyse, sont séparés de l'urine par trois méthodes :

- distillation à pH 8 (152 - 380)
- entraînement à la vapeur d'eau (52 - 379)
- extraction par un solvant organique, le plus souvent l'éther ou l'acétate d'éthyle. Elle s'effectue en général à pH neutre ou légèrement alcalin (23 - 32 - 396), pour éviter l'extraction des acides phénols, ou à pH 1 où l'extraction est plus complète mais nécessite l'élimination des acides phénols, réalisée par SCHMIDT (304), en extrayant par le mélange éther - éthanol à différentes concentrations.

La phase organique est ensuite évaporée puis reprise par un tampon si le dosage s'effectue en milieu aqueux (235) ou simplement réextraite par un tampon. Les méthodes d'extraction ont un rendement d'environ 90 % avec le phénol mais la perte est plus importante pour les autres phénols surtout avec les diphénols. (15)

III.3. TECHNIQUES DE DOSAGE :

Du fait de leur grande réactivité chimique, les phénols sont dosés par un grand nombre de techniques.

III.3.1. Gravimétrie :

Ce fut la première méthode employée. Les phénols, par l'action du brome en milieu acide, sont précipités à l'état de tribromophénols insolubles qui, après séparation, sont lavés, séchés et pesés. Cette technique fut employée par BAUMANN (24) dès 1876, puis par BRIEGER (50) et SCHMIEDEBERG (306). Une gravimétrie est encore utilisée par BECKERING et FOWLES (30), pour doser le pyrocatechol précipité par l'acétate de plomb.

Ces techniques ne sont plus utilisées de nos jours pour doser les phénols urinaires.

III.3.2. Titrimétrie :

Les méthodes titrimétriques sont basées, comme pour les techniques gravimétriques, sur la formation d'un dérivé bromé ou iodé avec les phénols, mais c'est l'excès de réactif bromant ou iodant qui est titré par iodométrie (55 - 159 - 188 - 222 - 228 - 242). La bromation en milieu acétique est catalysée par la pyridine pour les phénols non substitués en ortho ou para (167). La méthode, couplée à une précipitation en différents tampons, permet à BAERNSTEIN (10) de titrer séparément le phénol et les diphénols.

Ces méthodes sont aujourd'hui abandonnées pour doser les phénols urinaires.

III.3.3. Colorimétrie :

La première méthode utilisait le picrate d'ammonium comme réactif colorant, avec comparaison avec une galerie témoin (39).

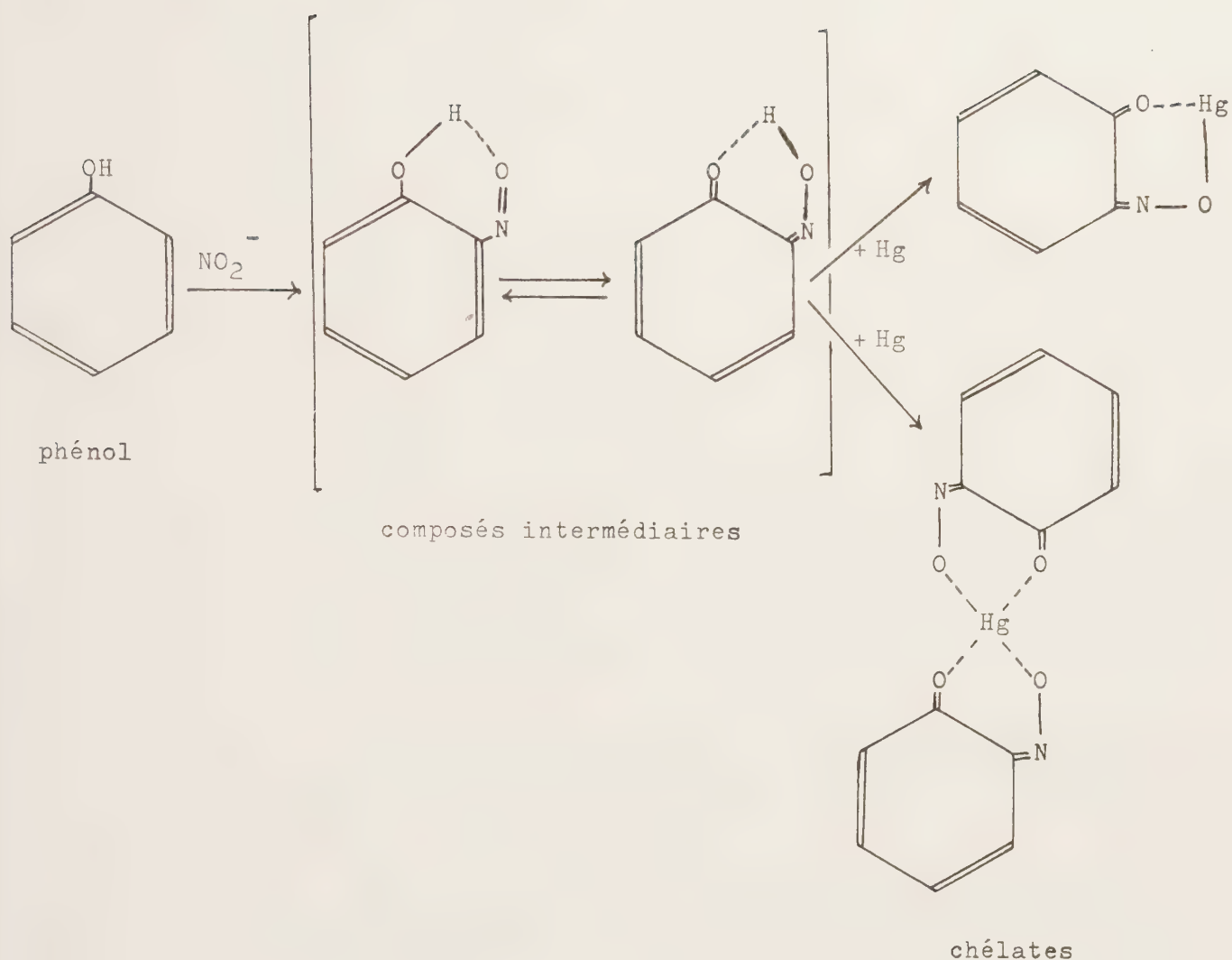
Plus souvent, la colorimétrie met à profit la formation de complexes avec les ions ferriques, mercureux et mercuriques, ou la propriété réductrice de la fonction hydroxylée. Généralement, ces réactions sont sensibles mais obtenues avec de nombreux autres composés (268). C'est pourquoi des réactions plus spécifiques sont utilisées : diazocopulation et formation d'indophénol.

III.3.3.1. Formation de complexe :

- Le chlorure ferrique conduit à la formation d'un complexe du type $[\text{Fe}(\text{OAr})_6]^{3-}$ coloré en bleu, violet ou rouge.

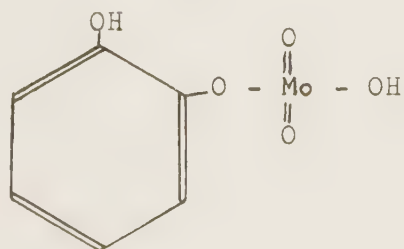
Les substituants en ortho ou para déterminent une moins grande stabilité de la couleur obtenue et la coloration disparaît avec chauffage avec la vanilline. La présence de substituants en méta est au contraire favorable. La réaction est donnée par de trop nombreux composés, même non phénoliques, pour être utilisée (268).

- Le réactif de MILLON : c'est un mélange complexe en solution acide d'ions nitrate, nitrite, mercureux et mercurique, préparé par dissolution de mercure dans l'acide nitrique. Suivant le phénol en cause, la coloration évolue du jaune au rouge. Le mécanisme de la réaction (175) comporterait d'abord une ortho nitrosation par action des ions nitreux. Le dérivé formé, en équilibre avec sa forme tautomère qui est la mono oxime d'une ortho-quinone, serait ensuite stabilisé par formation d'un chélate mercuriel fortement coloré :



La réaction est donnée par tous les phénols mais avec le para crésol et l'hydroquinone la loi de BEER est mal respectée. Cette technique est employée par INGLETT et Coll. (168), TAMM (339) et TEISSINGER et Coll. (347), pour doser les phénols urinaires.

- La formation de complexes du pyrocatechol avec les ions molybdate, tungstate (157-236) ou cobalt (9), est mise à profit pour son dosage. Le complexe formé est, avec le molybdate :



La réaction est spécifique des ortho diphénols. HEISTAND (157) a automatisé la méthode au tungstate pour doser le pyrocatechol urinaire.

III.3.3.2. Réduction d'un réactif :

Trois réactifs sont utilisés :

- le ferricyanure ferrique réduit en bleu de Prusse,
- le réactif phosphomolybdique en milieu alcalin,
- le réactif phosphomolybdotungstique;

Les colorations obtenues sont bleues.

Les réductions sont obtenues avec tous les phénols, mais aussi avec les ions réducteurs, les sucres, les amines aromatiques et l'acide urique.

Elles ont été employées pour doser les phénols en biologie par FOLIN et DENIS (118), puis par SCHMIDT (305), BARNES et Coll. (23) et BEHRMAN et Coll. (31), surtout avec le réactif phosphomolybdotungstique.

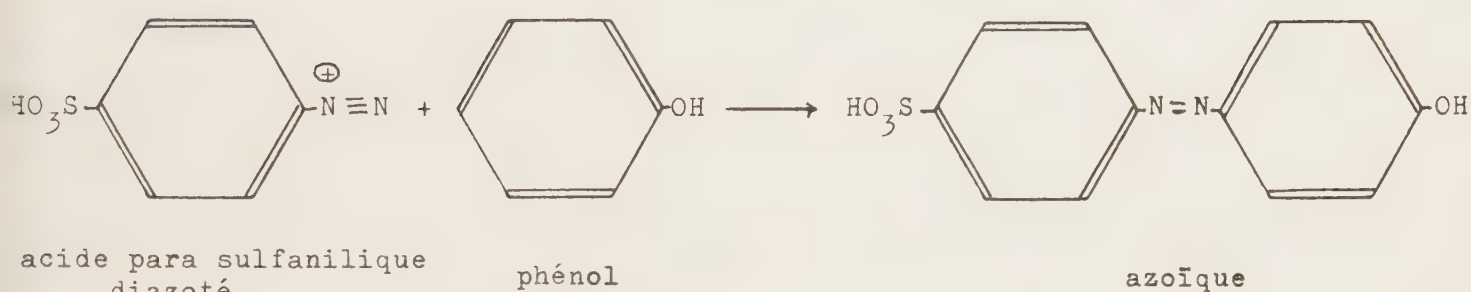
III.3.3.3. Diazocopulation :

Parmi les réactions colorées fournies par les phénols, la diazocopulation occupe une place privilégiée. La formation d'oxyazoïque, dont l'intense coloration en milieu alcalin est attribuée à l'existence d'une structure para-quinonique, est très sélective. La copulation se produit généralement avec tous les phénols, sauf les trisubstitués. Plusieurs composés sont employés pour effectuer cette copulation :

- Acide para sulfonique diazoté : la coloration est variable selon le phénol en cause, mais pour les substitués

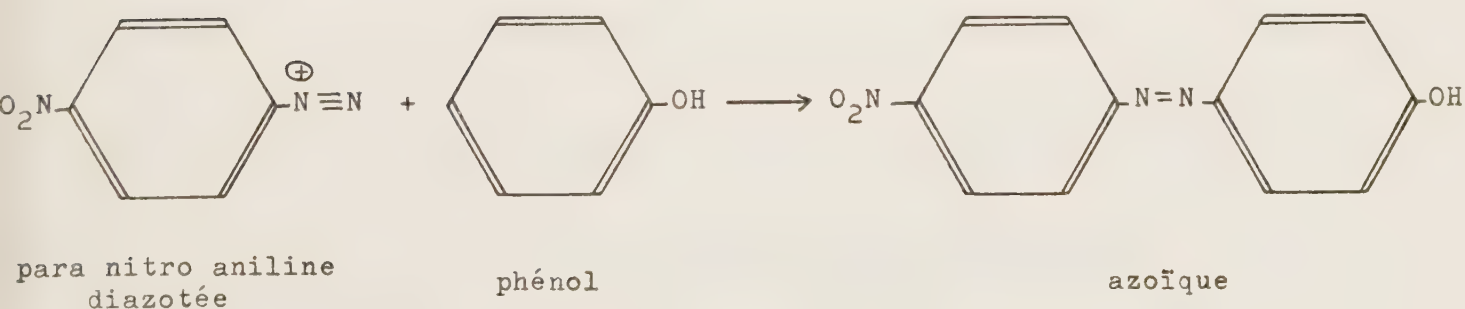
en ortho et méta, elle est le plus souvent jaune, et rouge avec une substitution en para (151).

La réaction est la suivante :



La réaction se produit aussi avec les dérivés à cycle imidazolique. Elle est employée par SCHMIDT (305), TALLON et Coll. (337) et INGLETT et Coll. (168).

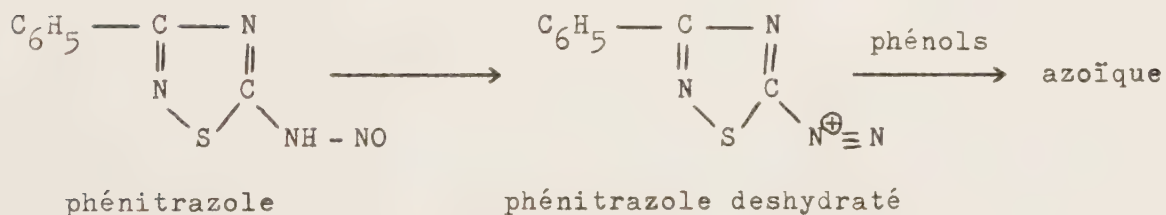
- Paranitro aniline diazotée : la copulation se produit en milieu alcalin, avec formation d'un azoïque jaune à rouge, extractible par l'acétone (373).



De nombreux modes opératoires ont été décrits pour des cas particuliers car les conditions favorables pour l'intensité et la stabilité des colorations varient pour chaque phénol. La réaction se produit aussi avec les hétérocycles azotés.

Elle a été introduite en biologie par THEIS et BENEDICT (350) et a été très utilisée ensuite (52 - 235 - 281 - 320 - 379). L'absorption maximum étant à une longueur d'onde différente, selon le phénol (320 - 374), permet théoriquement un dosage séparé. Il est toutefois préférable d'effectuer une séparation par distillation fractionnée (380), chromatographie ou réaction chimique. Ainsi le para crésol est dosé sans ses isomères après contact avec l'oxyde de magnésium en solution alcaline (113), ou le pyrocatechol et l'hydroquinone après oxydation par l'oxyde cérique (32).

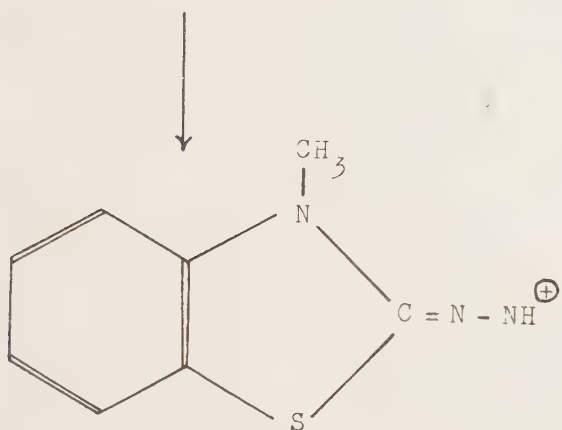
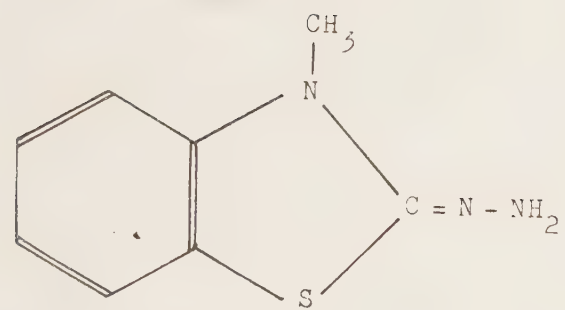
- Phénitrazole : la copulation s'effectue avec le sel de diazonium obtenu par deshydratation in situ du 3 phényl 5 nitrosamino 1, 2, 4 thiodiazole ou phénitrazole.



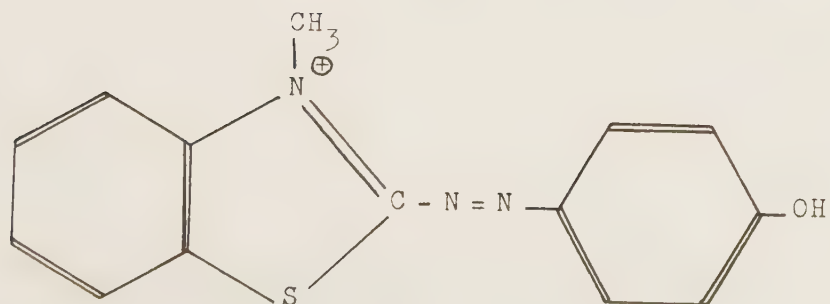
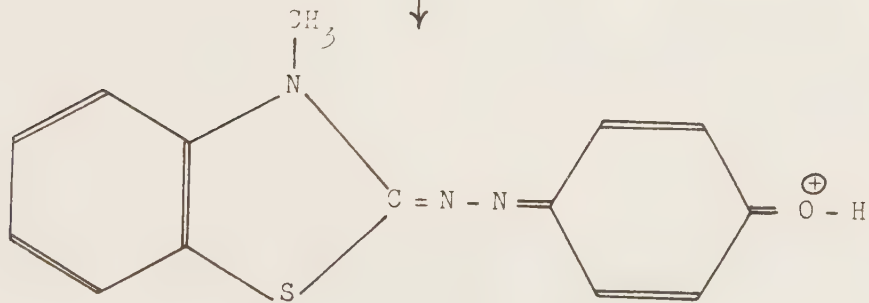
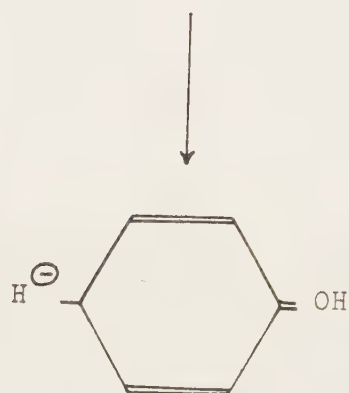
L'azoïque formé est jaune, rouge ou violet. La réaction se produit avec tous les phénols mais aussi avec les arylamines et les aldéhydes. Elle est employée pour les phénols urinaires par ZIRINIS (396).

- 3 méthyl 2 benzothiazolinone hydrazone : réactif HMBT. La copulation est effectuée en milieu acide, en présence d'un système oxydant $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$, ou en milieu alcalin en présence du ferricyanure de potassium (262) ou du nitrate cérique (125 - 368). PAYS et BOURDON (262) en proposent le mécanisme suivant :

HMBT



phénol



La coloration obtenue est rouge. Elle apparait avec tous les phénols mais, avec ceux substitués en para, la réaction ne se produit qu'en milieu acide pour l'hydroquinone et qu'en milieu alcalin pour le para crésol. La méthode a été automatisée par FRIESTAD (125).

- Autres réactifs employés :

- le 2-4 dinitro phényl hydrazine (294) en présence de chloramine T.
- le nitro amino anisol diazoté (265) en milieu acide.

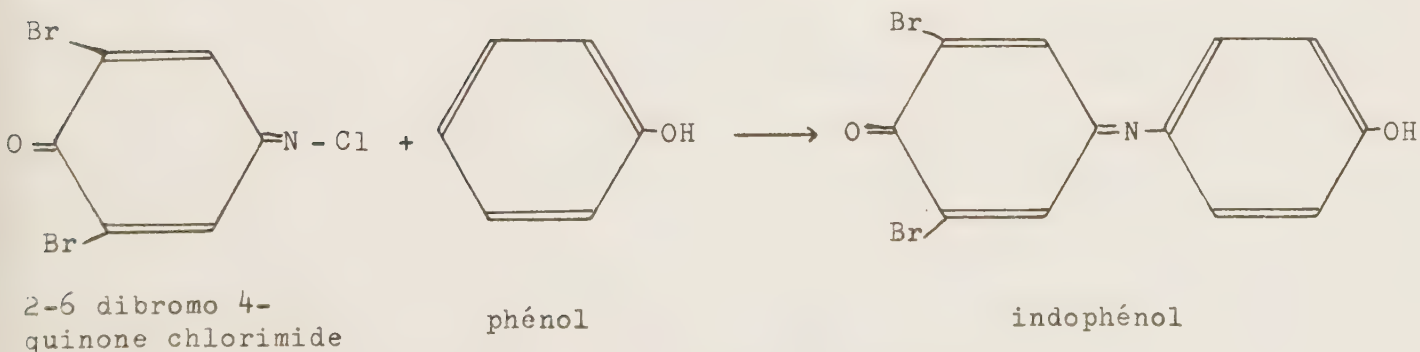
III.3.3.4. Formation d'indophénol ;

Comme dans le cas de la diazocopulation, dans ces réactions très sélectives, la formation d'une structure para quinonique est responsable des intenses colorations obtenues.

Les réactifs les plus employéssont :

- 2-6 dichloro ou dibromo quinone 4 chlorimide :

la condensation s'effectue en milieu alcalin. Elle se traduit par une coloration bleue à rouge - violet.

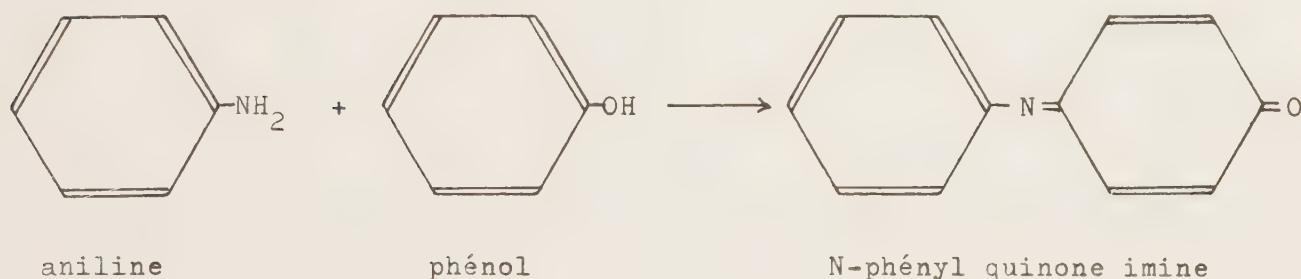


La sensibilité de la coloration dépend du type de phénol et l'intensité diminue rapidement avec le temps (54).

Une substitution en para rend le plus souvent l'essai négatif.

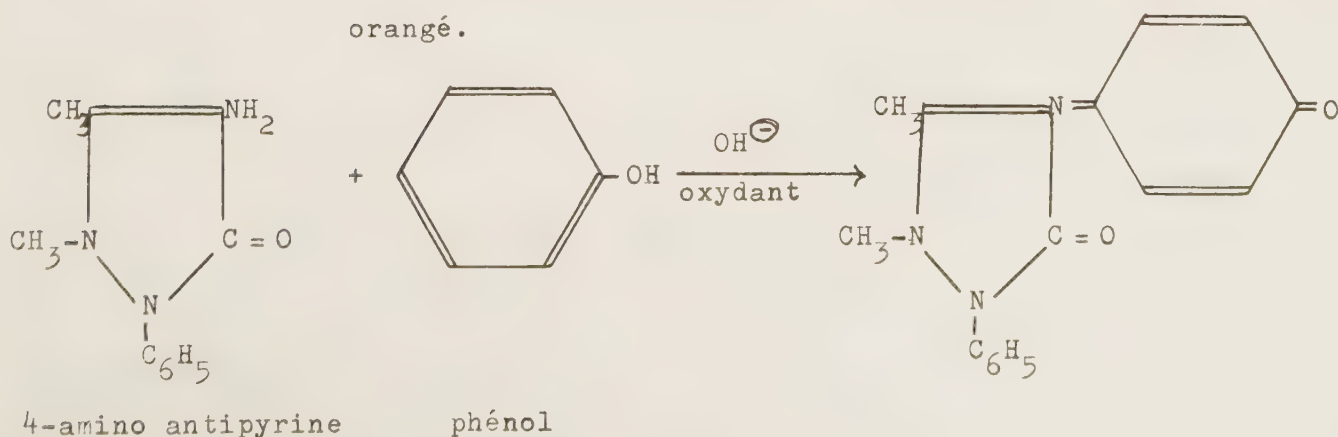
Ce réactif fut retenu par GIBBS (140) pour caractériser et doser les phénols. Il est employé par PORTEOUS et WILLIAMS (274), IKEDA (164) et TEISSINGER (347) pour doser les phénols urinaires.

- Aniline et hypochlorite : par action de l'hypochlorite en présence d'aniline, les phénols forment une N-phényl quinone imine. La coloration obtenue est bleue.



La réaction est négative si le phénol est substitué en position ortho ou para par un radical hydroxyle.

- 4-amino antipyrine : la 4-amino antipyrine ou 4-amino phénazone, se condense avec les phénols en milieu alcalin en présence d'un oxydant qui est généralement le ferricyanure de potassium. La coloration obtenue est rouge orangé.



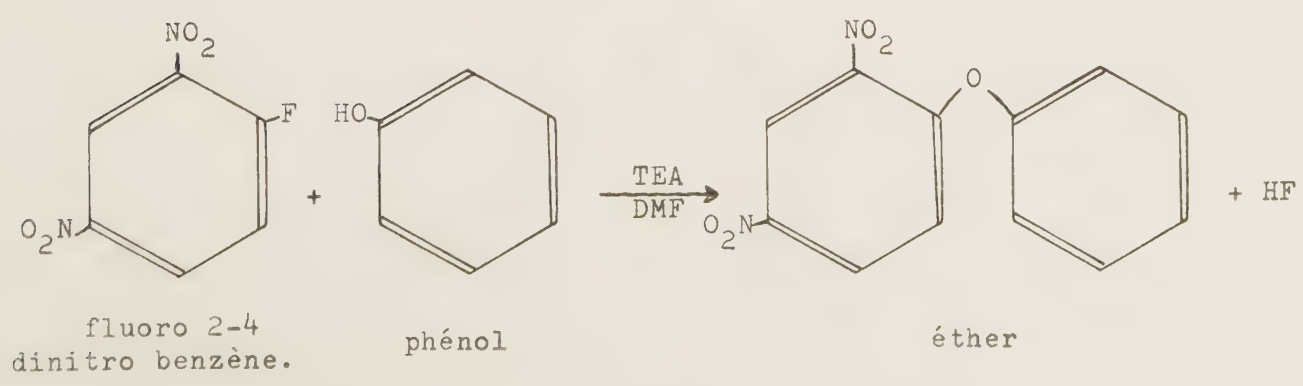
La réaction est fournie par les phénols ayant la position para libre ou substituée par un radical tel que OH, halogène, acide. Avec les catéchols, elle est obtenue sans addition de réactif oxydant. La même réaction se produit si la 4 amino antipyrine est remplacée par le pyramidon (amidopyrine) (269). Les tampons borate pH 9 - 10,5 (198), chlorure d'ammonium - ammoniacque (268) ou phosphates pH 8, sont les plus souvent employés. Outre le ferricyanure de potassium, l'oxydant peut être le tétrathionate de potassium (332 - 333) ou le persulfate d'ammonium (276). La réaction est rendue plus sensible par extraction chloroformique de la coloration puis concentration (97). FOSTER et MALINAKOVA (121) trouvent des résultats comparables à ceux obtenus en employant la réaction de GIBBS. Cette méthode est aussi employée par EMERSON (94) et INGLETT et Coll. (168).

- La formation d'indophénols peut aussi être obtenue avec la para nitroso diméthyl aniline réduite en présence de ferricyanure de potassium (268).

III.3.3.5. Formation d'éther :

Les phénols sont condensés avec le fluoro 2-4 dinitro benzène en milieu alcalin.

La réaction est catalysée par la triéthylamine (TEA) dans la diméthylformamide (DMF).



L'éther formé est extrait par le chloroforme puis photométré. La réaction est produite par tous les phénols. Elle est employée par PEDRO et LEHMANN (264) et TRENT'EV (361).

III.3.3.6. Réactions particulières :

Ces réactions sont produites avec les phénols substitués.

- Substitution en para : les phénols substitués en para se condensent à chaud avec le 1-nitroso 2-naphtol en milieu nitrique. La coloration obtenue est rouge mais vire au jaune qui est stable (369).

La réaction est utilisable avec le para-crésol ou l'hydroquinone, si ceux-ci sont à une faible concentration.

- Méta di-phénols : les méta di-phénols sont traités par la 3,3 diphénylacroléine en milieu chlorhydrique (268). La coloration obtenue est rouge.

La réaction se produit aussi avec les amines aromatiques primaires et certaines pyrimidines.

III.3.3.7. Réactions diverses :

D'autres réactions colorées sont obtenues avec différents réactifs qui sont :

- le benzol ou le chlorure de pipéronal dans l'acide trifluoroacétique (302),
- les vanadates des dérivés iodés de l'hydroxy 8-quinoléine (189),
- le tétracyanoéthylène (303).

III.3.4. Spectrométrie dans l'ultra-violet :

Elle compte parmi les méthodes les plus facilement

accessibles pour l'identification et le dosage des phénols. Les variations de pH par l'emploi de différents tampons (265, - 267) ou la formation de dérivés bromés (266) permettent à PELLERIN et Coll. une caractérisation et un dosage de chaque phénol qui absorbe, dans les conditions décrites, à une longueur d'onde caractéristique. BARAC (19) et WEXLER (382) emploient cette méthode pour doser les phénols dans différents milieux biologiques.

III.3.5. Spectrométrie en infra-rouge :

C'est surtout une méthode de caractérisation car chaque phénol a un spectre infra-rouge caractéristique. Cependant, l'absorption voisine de 2770 nm est utilisée par GODDU (143) pour leur dosage.

III.3.6. Résonnance magnétique nucléaire (RMN) :

Après estérification par l'acide trifluoro acétique (187) ou le chlorure d'acétyl (210), les phénols peuvent être caractérisés puis dosés par RMN, l'ester obtenu étant dissous dans le tétrachlorure de carbone (282). La méthode permet de doser séparément les différents isomères.

III.3.7. Méthodes chromatographiques :

La séparation des phénols est principalement effectuée par les méthodes chromatographiques de partage. Les plus employées sont les chromatographies sur papier, en couche mince et en phase gazeuse.

III.3.7.1. Chromatographie d'exclusion - diffusion :

Les phénols sont séparés par chromatographie sur Séphadex G²⁵, les éluants employés par WOOFF et PIERCE (389) étant l'acide acétique dilué, l'eau ou l'ammoniaque. La détection s'effectue par les méthodes colorimétriques ou la spectrométrie dans l'ultra-violet. La méthode permet de doser les phénols séparément, surtout les isomères diphénoliques.

III.3.7.2. Chromatographie liquide - liquide :

YOUNG (393) emploie comme phase stationnaire l'eau acidifiée mélangée au silicagel comme support, et FRITZ et HEDRICK (126) le cyclohexane pur ou mélangé à l'hexanol sur Téflon-6 ou polyéthylène poreux. Les phases mobiles utilisées sont respectivement le cyclohexane et une solution de chlorure de sodium dans l'eau, ou le méthanol aqueux. Dans les deux cas, la détection est une spectrophotométrie dans l'ultra-violet. Les auteurs emploient cette méthode avec succès pour doser, par mesure de l'aire des pics obtenus, le phénol, les crésols et les diphénols.

III.3.7.3. Chromatographie sur papier :

Le support papier est employé tel quel ou après imprégnation avec la formamide (67 - 135 - 331), le chlorure de calcium (176), l'amberlite (61 - 211), l'oléate d'éthyl (213), ou la polyhexaméthylène adipamine dans l'acide formique (215).

Les solvants employés, selon les différents auteurs, sont les suivants :

- Sur papier seul :

Butanol-benzène (1-1) saturé d'eau, par GOREN-STRUL et Coll. (146).

Benzène - acide acétique - eau (8-2-1), par DIETRICH (81).

Isopropanol - ammoniacque - eau (20-1-2), par BARNES et Coll. (23).

Butanol - pyridine - eau saturée de chlorure de sodium (1-1-2), par EVANS et Coll. (99).

Alcool amylique - benzène - eau (1-19-20), par RILEY (287).

REID (283) sépare et caractérise de nombreux composés phénoliques en utilisant 6 solvants :

A : isobutyl cétone saturé par une solution à 4 % d'acide formique.

B : chloroforme saturé du mélange méthanol - eau - acide formique (100-96-4).

C : benzène - éthyl méthyl cétone (9-1), saturé d'acide formique à 2 %.

D : benzène saturé d'acide formique à 2 %.

E : éthyl méthyl cétone - eau - diéthylamine (921-77-2).

F : éthyl méthyl cétone - acétone - eau - acide formique (80-4-12-2).

- Sur papier imprégné :

Eau - acide acétique à différentes concentrations, par LOCKE (211) et MARTIN (215).

Eau - acide acétique - butanol (2-1-6), par CLARK (61).

Eau - alcool (3-1), par MARCINKIEWICZ (213).

Eau - huile de paraffine - méthanol (2-3-2), par GASPARIC (135).

Benzène - chloroforme (1-1), par GASPARIC (135).

Cyclohexane - diméthylformamide à différentes concentrations, par GASPARIC (135).

Cyclohexane - diéthylamine (9-1), par KAPISINKA et KOSLJAR (176).

Cyclohexane - benzène (7-3), additionné de 3 % de dipropylène glycol, par CRUMP (316).

Cyclohexane - acétate d'éthyl (5-1) saturé de diméthylformamide - eau (5-2), par SUNDT (331).

Cyclohexane - acétate d'éthyl - acide acétique (5-1-1), par CLARK (61).

Les chromatogrammes obtenus sont généralement révélés par les réactifs colorimétriques vus précédemment, cependant CRUMP (316) préfère effectuer la chromatographie des azoïques obtenus avec la paranitroaniline diazotée. Tous les isomères phénoliques ne sont pas toujours séparés et ces méthodes se prêtent mieux à une caractérisation qu'à un dosage.

III.3.7.4. Chromatographie sur couche mince :

La chromatographie en couche mince a pour support un gel de silice, d'alumine ou de polyamide. Pour les phénols, la formation de liaison hydrogène, avec ces supports ou les solvants utilisés, joue un rôle prépondérant pour leur séparation. Pour GAREL (130), il est possible d'énoncer que cette liaison sera d'autant plus intense que l'hydrogène sera plus labile dans la molécule donneur et plus grande la densité électronique du doublet accepteur. De plus, la mobilité chromatographique d'un phénol est inversement proportionnelle au nombre d'hydroxyle dont la position n'est pas sans importance. Les constituants ortho, en raison de

l'existence de ponts hydrogène intramoléculaires, ont peu d'affinité avec le support et migrent avec le front du solvant, qu'il soit polaire ou non. Le même phénomène se produit avec un radical méthyl en ortho, probablement pour des raisons analogues.

L'échantillon phénolique à chromatographier est utilisé tel quel ou plus souvent sous forme d'azoïque ou d'un autre dérivé. De nombreux solvants sont utilisés :

III.3.7.4.1. Pour les phénols :

Eau - méthanol à différentes concentrations, par SHERMA et HOOD (315).

Cyclohexane - acétate d'éthyl (5-1), par KUSHNIR et Coll. (197).

Cette technique est peu employée car la chromatographie conduit à des groupes phénoliques plus qu'aux phénols séparés (261). La révélation s'effectue par colorimétrie.

III.3.7.4.2. Pour les dérivés phénoliques :

La chromatographie s'effectue sur l'azoïque formé avec la paranitroaniline, ou le produit de condensation avec la 4-amino antipyrine, ou plus simplement à l'état d'ester sulfate.

- Azoïque :

Trichloréthylène - diéthylamine (39-1), par RENAULT et GARTRON (284).

Benzène - diNpropylamine (4-1), par CRUMP (68).

Benzène - cyclohexane - dipropylène glycol (30-70-3), et benzène - cyclohexane - diéthylamine (5-5-1), par SMITH et SULLIVAN (321).

- Condensé avec la 4-amino antipyrine :
.....

Ce sont les dérivés obtenus qui ont été étudiés récemment par THIELEMANN (351 - 352 - 353 - 354 - 355) en employant différents solvants :

benzène
acétate de butyl
benzène - acétate de butyl (1-9)
dichlorométhane - cyclohexane (55-44)
dichlorométhane - benzène (1-1)
dichlorométhane - benzène - acétate d'éthyl - chloroforme (82-5-2-5)
dichlorométhane - acétate d'éthyl - éthanolamine (95-5-3).

En employant ces solvants, THIELEMANN sépare les crésols et la plupart des xylénols, sauf les isomères 2-3 et 3-5.

- Phénols sulfates :
.....

WUSTEMAN (391) effectue la chromatographie avec deux solvants :

benzène - éthylméthylcétone - éthanol - eau (3-3-3-1)
propanol - chloroforme - méthanol - eau (10-10-5-2)

La révélation est faite par pulvérisation de permanganate en milieu sulfurique.

Comme la chromatographie sur papier, la chromatographie sur couche mince sert principalement à caractériser les phénols. Cependant, elle peut être employée pour un dosage après extraction des spots, puis photométrie, ce qui permet de doser les phénols séparément.

III.3.7.5. Chromatographie en phase gazeuse :

La chromatographie en phase gazeuse utilisée est une

chromatographie gaz - liquide ; les constituants à séparer sont poussés à travers la colonne par un gaz inerte (gaz vecteur). Le mélange à analyser se trouve dissocié entre le gaz vecteur et un solvant volatil (phase stationnaire) réparti sur un solide inerte tamisé (support). La phase stationnaire retarde sélectivement les constituants de l'échantillon, selon leur coefficient de partage, jusqu'à ce qu'ils forment des bandes séparées dans le gaz vecteur. Ces bandes de constituants sortent de la colonne dans le courant de gaz et sont enregistrées en fonction du temps (219 - 360).

Les phénols urinaires sont chromatographiés avant et après hydrolyse, avec ou sans extraction préalable. L'hydrolyse phosphorique peut être effectuée directement au niveau de l'injecteur (370) généralement maintenu au-dessus de 200°. Les phénols étant très volatils, sont injectés le plus souvent sans traitement préalable et détectés par ionisation de flamme, mais certains auteurs préfèrent une méthylation (36), une acétylation (227) ou une silylation (244) préalable. Un détecteur à capture d'électrons qui augmente la sensibilité de détection est utilisable après estérification des phénols par un composé halogéné (5 - 62 - 179 - 227 - 317). Le gaz vecteur utilisé est l'azote ou l'hydrogène, ou l'hélium.

Les phases stationnaires, avec leurs températures d'utilisation, leurs supports, et les auteurs qui les emploient, sont les suivantes :

III.3.7.5.1. Pour les phénols tels quels :

- Graisse pour vide Saint Gobain à 30 % :

support : brique pilée

température d'utilisation : 165°, par KREYENBUHL et Coll. (192).

- Apiezon L, de 15 à 20 % :

- . support : chromosorb W ou P.
- . température d'utilisation :
 - 185° par KARLAMPOWI et Coll. (177),
 - 140° par SZEWCZYK (336),
 - 97 et 116° par LEBBE, LAFARGE et MENARD (204 - 221),
 - programmation par LOUWERSE (212) et SAKUPRA et Coll. (394).
- . support : célite 545.
- . température d'utilisation :
 - programmation par FRITZGERALD (127).

- Silicone UC-W 98 à 10 ou 15 % :

- . support : chromosorb W.
- . température d'utilisation :
 - 180° par GASPARIC (135),
 - 120° par BAKKE et SCHELIN (14),
 - programmation par KUSHNIR et Coll. (197).

- Silicone XE 60 à 15 % :

- . support : diatoport W.
- . température d'utilisation :
 - programmation par LOUWERSE (212).

- Di-éthylène glycol adipate, à 5 ou 10 % :

- . support : chromosorb W.
- . température d'utilisation :
 - 150° par SEDIVEC et Coll. (310), VANHRAFTEN et Coll. (370).

- . support : universal B
- . température d'utilisation :
150° par SHERWOOD et Coll. (316)
- . support : embacel
- . température d'utilisation :
135° par LINSAY - SMITH et Coll. (209).
- Néopentyl glycol succinate, à 3 % :
 - . support : chromosorb W
 - . température d'utilisation :
116° par LEBBE, LAFARGE et MENARD (204 - 221).
135° par DESOILLE et Coll. (79).
- Carbowax 20 M, à 1 % et 10 % :
 - . support : chromosorb W
 - . température d'utilisation :
programmation par BAKKE et SCHELINE (14).
 - . support : gaz chrom
 - . température d'utilisation :
programmation par LOUWERSE (212).
- Tricrésyl phosphate, à 2 % :
 - . support : chromosorb W
 - . température d'utilisation :
120° par BAKKE et SCHELINE (14),
160° par MOSKOVSKIKH et Coll. (231).

Cette phase stationnaire présente l'avantage de séparer le méta et le para crésols.

- Tri (2-4 xylényl) phosphate, à 5 % :
 - . support : chromosorb W
 - . température d'utilisation :
130° par GOREN - STRUL (146).
 - . support : embacel
 - . température d'utilisation :
135° par LINDSAY - SMITH et Coll. (209),
110° par KOLSEK et Coll. (185).
 - . support : sphérochrome.
 - . température d'utilisation :
150° par KUDRYAUTSEVA (194).
 - Ortho chloro phényl phosphate, à 20 % :
 - . support : célite 545.
 - . température d'utilisation :
135° par LINDSAY - SMITH et Coll. (209).
 - Octatis 2-4 xylyl penta érythritol tétraphosphate :
 - . support : chromosorb W
 - . température d'utilisation :
145° par BOYDEN et BROWN (41).
- Cette phase sépare les méta et para crésols.
- Di n-octyl phtalate, à 31 % :
 - . support : brique pilée.
 - . température d'utilisation :
160° par KARR et Coll. (178).

- Do ~~d~~écyl benzène sulfonate, à 12 % :

. support : célite 545.

. température d'utilisation :

programmation par FRITZGERALD (127).

* Phases stationnaires utilisées en colonne capillaire :

- Tri (ortho ou méta ou para crésyl) phosphate :

. température d'utilisation :

120° par HRIVNAK et Coll. (160 - 161),

programmation par BARBER et Coll. (20).

- Tri (2-4 xylényl) phosphate :

. température d'utilisation :

120° par HRIVNAK et Coll. (160),

125° par FREEDMAN et Coll. (122).

chargé de di(3,3,5 triméthyl cyclohexyl) O phtalate :

. température d'utilisation :

60° par LANDAULT et Coll. (201).

III.3.7.5.2. Phénols estérifiés :

- Méthylation :

. phase : apiezon L, à 8 et 10 %.

. support : célite 545.

. température d'utilisation :

140 et 180° par BHATTA CHARYYA et Coll. (36).

- Sililation :

Elle est effectuée par l'héxaméthylidisilazane (122 - 244).

. phase : tri (2-4 xylényl) phosphate, en colonne capillaire (122).

- . phase : silicone OU 17, à 3 %.
- . support : chromosorb W.
- . température d'utilisation :
programmation par NOMIYAMA (244).

- Acétylation :

- . phase : trixylényl phosphate + 3 à 4 % de bentone B 27.
- . support : embacel
- . température d'utilisation :
140° par MLEJWEK (227).

- Par un dérivé halogéné :

L'estérification par un dérivé halogéné permet d'utiliser un détecteur à capture d'électron avec lequel la sensibilité est augmentée. Plusieurs agents estérifiant sont utilisés :

* 1 fluoro_2-4_dinitro_benzène :

- . phase : silicone XE 60 à 1 % + 0,1 % d'épitrane 1001.
- . support : chromosorb G.
- . température d'utilisation :
215° par COHEN et Coll. (62).

* Anhydride_trifluoro_acétique :

- . phase : silicone 710 et tri O-phényl-phényl phosphate.
- . support : brique pilée.
- . température d'utilisation :
108° par SHULGIN (317)

* α bromo 2,3,4,5,6-pentafluorotoluène :

- . phase : silicone DC 200 à 3 %, et silicone QF₁ à 5 %
(50 % - 50 %)
- . support : chromosorb P
- . température d'utilisation :
200° par KAWAHARA (179).

* Anhydride trichloracétique :

- . phase : silicone XE 60.
- . support : anakrom ABS.
- . température d'utilisation :
170° par ARGAUER (5).

Les méthodes après estérification présentent l'avantage de séparer tous les isomères crésols et xylénols. La chromatographie en phase gazeuse a l'avantage sur les autres chromatographies de permettre une caractérisation et un dosage simples et rapides des différents phénols urinaires.

III.4. RESULTATS :

Le phénol, les crésols et les xylénols urinaires constituent les phénols volatils urinaires. Ils proviennent du métabolisme de la tyrosine (11) et résultent surtout de la putréfaction bactérienne dans l'étendue intestinale (28 - 29) car, chez les rats nés "germ-free", seules des traces de phénol peuvent être détectées (17). La présence de phénol dans les urines, sous forme libre et conjuguée, a été mise en évidence dès 1851 par STADELER (329), puis par LIEBEN (208) et LANDOLT (202). A l'état normal, les phénols volatils sont formés de phénol, de para crésol (66 - 82 - 190) et de xylénols dont les isomères 2-6, 3-5, 2-5 et 3-4 ont été caractérisés par MENARD (221). Le

principal est le para crésol qui représente environ 90 % des phénols volatils (305).

III.4.1. Taux normaux :

Ils sont très variables, selon la méthode de dosage employée. Les techniques gravimétriques, titrimétriques, colorimétriques, mesurent les phénols urinaires dans leur ensemble. Les méthodes après séparation et plus spécialement chromatographie, permettent de déterminer le taux de chaque phénol et plus particulièrement du phénol et du para crésol.

Les taux normaux des phénols volatils urinaires avec les techniques employées, et leurs auteurs, sont réunis dans les tableaux I et II.

Selon VAN HAAFTEN (370), les taux de phénol et de para-crésol urinaires ne varient pas selon le moment de la journée si, comme le préconise BARDODEJ (21), ces taux sont corrigés en tenant compte de la densité des urines. De plus, les taux sont semblables chez les fumeurs et chez les non fumeurs.

III.4.2. Variations lors de l'exposition au benzène :

Le taux de phénol urinaire varie proportionnellement à la concentration du benzène dans l'atmosphère (234 - 375). Ceci a fait utiliser le dosage du phénol urinaire comme test d'exposition au benzène (115 - 121 - 330). DUTKIEWICZ (85) collecte les urines entre la sixième et la huitième heure, ou en fin de travail, un seul examen d'urine étant suffisant pour avoir une idée de l'exposition (173). Les méthodes de dosages sont celles utilisées pour déterminer les taux

AUTEURS	METHODES	PHÉNOLS LIBRES en mg	PHÉNOLS TOTAUX en mg
BAUMANN (24) BRIEGER (50) SCHMIEDEBERG (306)	gravimétrie		1250 par l. 30 à 280 par l. 90 par l.
KOSSLER (190) NEUBERG (242) MOOSER (228) HENSEL (159)	titrimétrie		30 à 106 par 24 h. 32 à 35 par 24 h. 28 à 53 par 24 h. 60 par l.
BARNES (23)	colorimétrie avec ré-actif de FOLIN.	2,8 à 8,8 par 24 h.	17,5 à 79,5 par 24 h.
TEISINGER (347)	colorimétrie avec ré-actif de MILLON		4,7 à 77,8 par l.
TEISINGER (347) WALKLEY (379) DEICHMAN (74) MUNFIG (235) SCHMIDT (304)	colorimétrie à la para - nitro aniline diazotée	0 à 3,8 par 24 h. 166 à 272 par 24 h. 0,5 à 0,8 par 24 h.	3,2 à 41,3 par l. 15 à 50 par l. 13 à 42 par 24 h. 40 à 90 par 24 h.
GOMORI (145)	colorimétrie avec le 5 nitro 2 amino anisol		0,9 à 44 par l.
IKEDA (164) TEISINGER (347) PROTEOUS (274)	colorimétrie à la 2-6 dibromo quinone chlorimide	0	8,3 à 81,5 par l. 0,1 à 17,9 par l. 5 à 10 par l.

TABLEAU N° I

Taux de crésol des piéncols dans l'air

auteurs	méthodes	phénol (mg)		para crésol (mg)		pyro-catéchol (mg)	hydro-quinone (mg)
		libre	total	libre	total		
SCHMIDT (305)	colorimétrie avec FOLIN, après extraction différentielle		8,3 à 12,7 par 24 h.		65 à 117 par 24 h.		
SCHMIDT (304)	colorimétrie avec para nitro aniline diazotée.		15 à 41 par 24 h.				
AZOUZ (9)	colorimétrie après formation d'un complexe avec CO ⁺⁺					0,75 à 7,1 par 24 h.	
BERGEROVA (32)	para nitro aniline modifiée					5 par l.	0
MENARD (221) et LEBBE et Coll. (204)	chromatographie ♂	7,6/1,2 l.	10,4/1,2 l.	39,5/1,2 l.	57,1/1,2 l.		
	en phase gazeuse ♀	6,8/1,2 l.	11,3/1,2 l.	25,9/1,2 l.	79,3/1,2 l.		
VAN HAAFTEN (370)			5/l.		89/l.		

normaux, mais actuellement, seules les méthodes colorimétriques et la chromatographie en phase gazeuse restent employées. TEISINGER et Coll. (347), effectuant le test au phénol par colorimétrie à la 2-6 dibromoquinone chlorimide, estime qu'une exposition de 8 heures à 35 p.p.m. de benzène atmosphérique, augmente les phénols urinaires à 100 mg/litre. Pour JINDRICOVA (173), ce taux de phénols nécessite un examen médical approfondi. Utilisant la colorimétrie à la paranitro aniline diazotée, FABRE (103), au cours d'une intoxication chronique pendant 185 jours chez l'animal, mesure une augmentation de 110 à 390 mg/litre des phénols urinaires. WALKLEY, PAGNOTO et Coll. (255 - 379), utilisant la même méthode, trouvent qu'à une exposition de 25 p.p.m. de benzène atmosphérique, correspond un taux de 200 mg/l. de phénols. Effectuant le test chez des ouvriers exposés au solvant naphta, qui contient 9,3 % de benzène, à la concentration de 125 p.p.m., ils obtiennent des phénols urinaires entre 200 et 350 mg/litre. DOCTER (82) rapporte que les phénols urinaires passent de 50-55 mg/litre à 170-195 mg/l si la concentration benzénique passe de 7 à 25 p.p.m.

DESOILLE et Coll. (79), étudiant le métabolisme du benzène en l'injectant au lapin puis en dosant les métabolites en chromatographie en phase gazeuse, mettent en évidence une augmentation du phénol à un taux de 386 à 406 mg/l à 24 heures, puis une diminution du taux de 96 à 114 mg/l après 48 heures. SHERWOOD et Coll. (316) emploient le même dosage comme test d'exposition. Pour des personnes exposées à de faibles concentrations de benzène, les taux de phénol se répartissaient entre 8 et 58 mg/litre.

VAN HAAFTEN et Coll. (370) ont effectué le test au phénol en utilisant trois méthodes. Les résultats au cours

d'une faible exposition sont les suivants :

METHODES	PHENOL (mg/litre)		
	essai 1	essai 2	essai 3
colorimétrie à la para-nitro aniline diazotée.	66	36	60
colorimétrie à la 2-6 di-bromoquinone chlorimide.	44	15	12
chromatographie en phase gazeuse.	30	12	31

Les taux obtenus par chromatographie en phase gazeuse sont toujours plus bas que ceux obtenus avec les méthodes colorimétriques, car seul le phénol est dosé.

Le test au phénol est le meilleur test d'exposition au benzène par dosage des métabolites surtout si l'on corrige les taux trouvés en fonction de la ventilation pulmonaire et du rythme d'élimination urinaire (224).

III.4.3. Variations lors de l'exposition au toluène ou aux xylènes :

Le test au phénol n'est pas utilisé lors de ces expositions.

III.4.4. Variations diverses :

- L'alimentation produit des variations du taux des phénols urinaires. Ainsi un régime protéique diminue ce taux (12 - 119) qui est par contre augmenté par une alimentation riche en tyrosine (37 - 376).

- Certains états pathologiques influent sur les phénols urinaires. Ainsi une obstruction intestinale augmente leur taux qui est ramené dans ses limites normales par un traitement antibiotique (338 - 340). Les antibiotiques diminuent aussi le taux normal des phénols urinaires (219) et ceci dans une proportion pouvant atteindre 90 à 100 % (13 - 291).

- Si les dosages colorimétriques peuvent être faussés par les métabolites phénoliques d'autres hydrocarbures que le benzène, tel que le triméthyl benzène (292), il semble qu'en chromatographie en phase gazeuse la seule erreur ne puisse provenir que du phénol. En effet, celui-ci, très volatil, est absorbé par voie pulmonaire, mais aussi par voie cutanée, surtout s'il est en solution aqueuse ou huileuse (64 - 271), puis est éliminé dans les urines.

- C H A P I T R E · T R O I S I E M E -

T R A V A U X P E R S O N N E L S
=====

La recherche d'un test permettant la détection et la surveillance des personnes en contact avec les hydrocarbures aromatiques (benzène, toluène et xylènes) est l'objet de notre travail. Une des solutions habituellement proposées pour la surveillance systématique des personnes exposées est le dosage des métabolites urinaires. Parmi ces derniers, nous avons choisi de doser les monophénols, seuls métabolites communs à ces trois hydrocarbures.

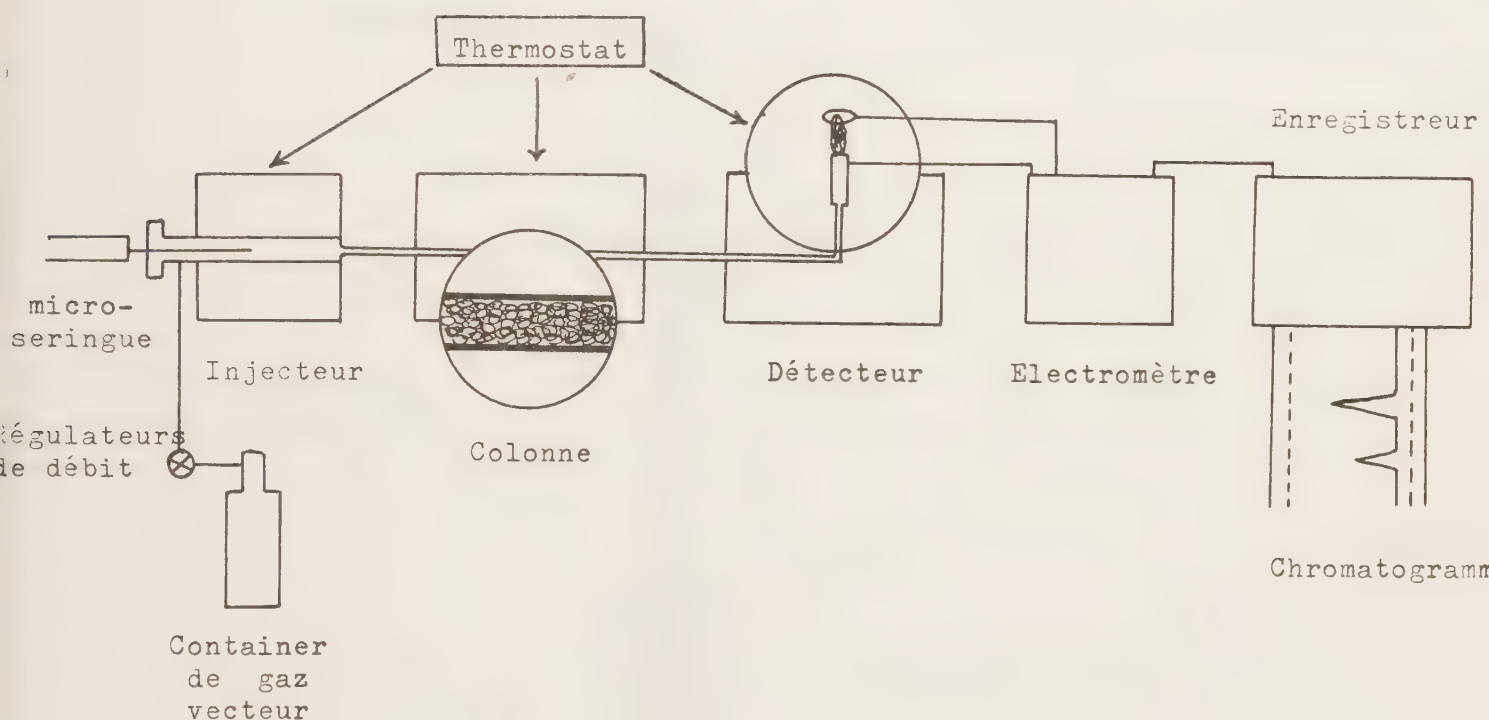
Le benzène, le toluène et les xylènes étant rarement utilisés seuls, les urines testées sont susceptibles de contenir un mélange des différents monophénols. Cela nous a conduit à rechercher une technique capable de séparer et de doser le phénol, les crésols et les xylénols urinaires. Notre choix s'est porté sur la chromatographie en phase gazeuse, seule technique rapide réunissant ces conditions.

La technique mise au point, nous avons réalisé 500 déterminations à partir d'échantillons prélevés chez des sujets exposés à un risque de contamination. L'étude statistique des résultats obtenus, et l'interprétation qui peut en être faite, permettent de conclure à la validité de la méthode proposée pour une utilisation systématique en hygiène industrielle.

I. DESCRIPTION ET CARACTERISTIQUES DU CHROMATOGRAPHE :

L'appareil mis à notre disposition est un F et M 810 - 19 à double colonne. La détection est effectuée par ionisation de flamme ; le signal obtenu, amplifié par un électromètre, est transcrit par un enregistreur Minneapolis-Honeywell.

Le schéma général du chromatographe est le suivant :

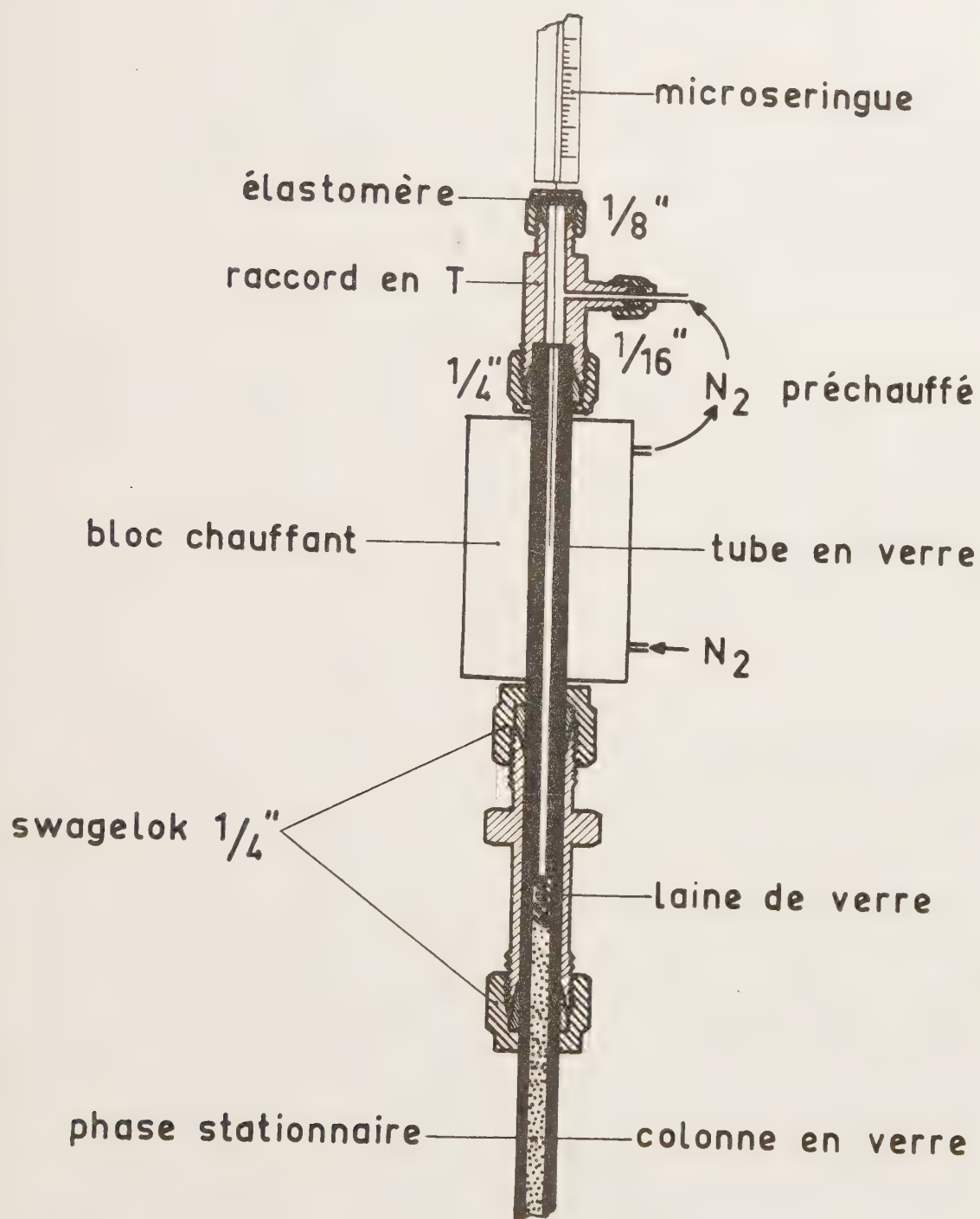


I.1. LE GAZ VECTEUR :

Le gaz vecteur utilisé est l'azote. Dans les colonnes, son débit est maintenu constant par un ensemble de régulations. Cet ensemble est constitué par deux détendeurs montés en cascade entre le container sous pression et l'appareil, puis par un rotamètre et un contrôleur de débit situé juste avant l'injecteur. Le débit est en fonction des conditions optima de travail des colonnes.

I.2. L'INJECTEUR :

Pour éviter une adsorption ou une dégradation possible des phénols sur le métal de l'injecteur original (acier inoxydable) nous l'avons



échelle : 1

FIGURE N° 7 :

SCHEMA DU SYSTEME D'INJECTION

remplacé par un système d'introduction en verre dont le schéma est représenté par la figure n° 7. Le tube en verre dans lequel s'effectue l'injection a les caractéristiques suivantes :

- longueur 80 mm
- diamètre extérieur .. 6 mm
- diamètre intérieur .. 2 mm

Par le bloc chauffant il est maintenu à la température de 220°.

Outre le fait d'être en verre pour éviter la dégradation des échantillons, ce système d'injection présente plusieurs avantages :

- le tube en verre peut être facilement démonté. Cela est nécessaire car, injectant directement l'urine, il faut procéder à son nettoyage fréquemment afin d'éliminer les matières non volatilisables qui se déposent au point d'injection.
- le faible diamètre intérieur du tube en verre permet de réduire le volume mort de la chambre d'injection ce qui favorise une meilleure introduction de l'échantillon. D'autre part, la volatilisation rapide de l'échantillon s'accompagne inévitablement d'une expansion de volume créant ainsi une surpression au niveau de la chambre d'injection, et par un effet de "back flush", tend à provoquer une dispersion à contre courant de l'échantillon injecté. Pour remédier à cet inconvénient, nous avons créé avant la chambre d'injection une restriction à l'aide d'une longueur de tube capillaire (80 cm, 1/16 de pouce de diamètre extérieur et 0,25 mm de diamètre intérieur), ce qui favorise l'écoulement de l'échantillon vers la colonne. De plus, ce tube capillaire est enroulé autour du bloc d'injection et calorifugé de manière à amener le gaz vecteur à la température de l'injecteur. Cela évite toute possibilité de condensation en amont de la chambre d'injection.

I.3. LES COLONNES :

Faisant suite à l'injecteur, les colonnes constituent le coeur du

chromatographe. Elles sont placées dans un four thermostaté. Les colonnes utilisées sont en verre et présentent les caractéristiques suivantes :

- longueur 2,30 m
- diamètre extérieur .. 6,00 mm
- diamètre intérieur .. 4,50 mm

Le garnissage des colonnes est constitué par un support inerte sur lequel est imprégné une phase stationnaire.

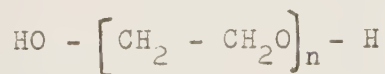
Le support utilisé, aéropak 30, de granulométrie 100 - 120 meshs, a été choisi en fonction des efficacités qu'il permet d'obtenir et son inertie particulière vis à vis des composés polaires.

Le choix des phases stationnaires est conditionné par plusieurs facteurs :

- la température de travail de la colonne. Celle-ci est choisie en fonction de la tension de vapeur des échantillons (appréciée par leur point d'ébullition) et des conditions qu'il faut réunir pour assurer une bonne séparation des composés chromatographiés.
- la polarité de la phase, plusieurs colonnes de polarité différente étant nécessaires pour assurer la séparation des constituants de l'échantillon étudié.

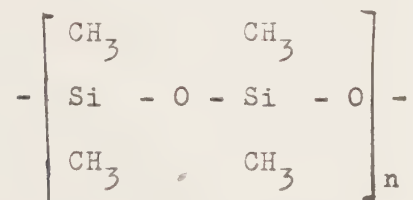
Parmi les phases stationnaires testées, deux ont été retenues : le carbowax 20M et le SE 30, utilisées aux taux respectifs d'imprégnation de 1 et 7 % poids/poids.

- le carbowax 20M est un poly-éthylène glycol :



c'est une phase très polaire. L'élution des composés chromatographiés s'effectue en fonction de leur polarité vis à vis de la phase.

. le SE 30 est un polymère siliconé :



c'est une phase peu polaire sur laquelle les composés sont en principe élués en fonction de leur point d'ébullition.

I.3.1. Imprégnation du support :

Les phases stationnaires sont dissoutes dans un solvant approprié à la concentration de 4,4 g/litre pour le carbowax dans le chloroforme, et 30,8 g/litre de SE 30 dans le toluène. Les solutions obtenues sont mises en excès (10 %) au contact du support (50 ml pour 20 grammes) dans une allonge de verre de 6 cm de diamètre avec disque de verre frité à la base. L'ensemble support - solution est dégazé par action conjuguée du vide branché en haut de la colonne et d'un vibreur agissant quelques secondes. Le vide cassé, l'excès de solution de phase stationnaire est soutiré par le bas de la colonne. Le solvant est alors évaporé :

- par chauffage à 50° dû à l'enroulement d'une résistance électrique à l'extérieur de l'allonge,
- par passage d'un courant d'azote arrivant au bas de la colonne.

Après répartition en couche mince de la phase ainsi préparée, un préconditionnement est effectué par mise à l'étuve à 120° pendant 12 heures. Il permet d'éliminer les matières volatiles de la phase.

I.3.2. Remplissage et conditionnement des colonnes :

Le remplissage est réalisé de manière classique, en

utilisant le vide et un vibreur. Les extrémités de la colonne sont fermées par des tampons de laine de verre préalablement lavés avec différents solvants.

Les colonnes sont portées dans le four, branchées à l'injecteur, puis conditionnées pendant 24 heures par chauffage à 220°, les colonnes étant parcourues par le gaz vecteur. Elles sont ensuite reliées au détecteur et laissées 24 heures à leurs températures d'utilisation, 150° pour la colonne de carbowax 20M et 140° pour celle de SE 30.

1.3.3. Vérification des performances des colonnes :

Elle est obtenue par la détermination de l'efficacité de la colonne. Cette efficacité est exprimée en nombre de plateaux théoriques ou la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT), calculés à partir du chromatogramme d'un échantillon de référence, en utilisant les relations :

$$n = 5,54 \frac{d^2}{w^2} \qquad \text{HEPT} = \frac{L}{n}$$

n = nombre de plateaux théoriques

d = distance de rétention en mm

w = largeur du pic à mi-hauteur, en mm

HEPT = exprimé en mm

L = longueur de la colonne en mm.

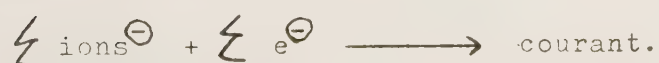
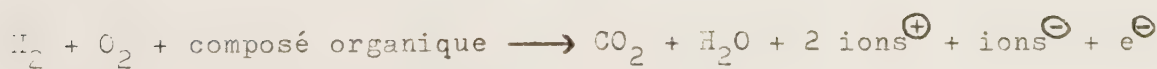
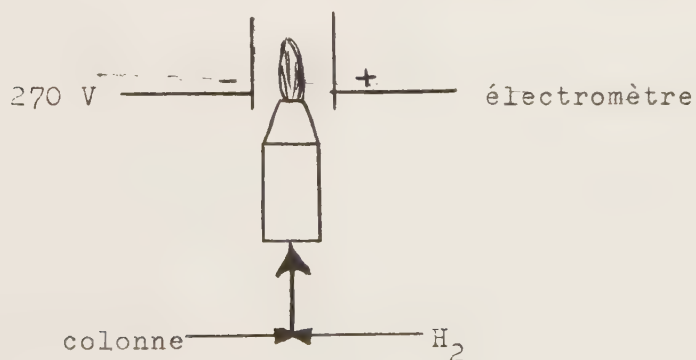
Les résultats suivants ont été obtenus en prenant le phénol comme référence, dans les conditions optima de débit du gaz vecteur.

colonnes	n pour la colonne	n/m	HEPT (mm)	débit du gaz vecteur en : ml/mn.
carbowax 20M	3000	1300	0,766	75
SE 30	2150	935	1,073	50

Ces valeurs montrent que les performances des colonnes que nous avons préparées sont comparables à celles obtenues habituellement pour ce type de colonne.

I.4. DETECTEUR - ELECTROMETRE :

L'appareil est équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme d'hydrogène, qui fonctionnent suivant le schéma de principe ci-dessous :



La réponse de ce type de détecteur dépend du nombre de molécules qui entrent dans le détecteur par unité de temps. Elle est proportionnelle

au nombre d'atomes de carbone par molécule. Exprimée selon le système standard ASTM, la sensibilité du détecteur est de :

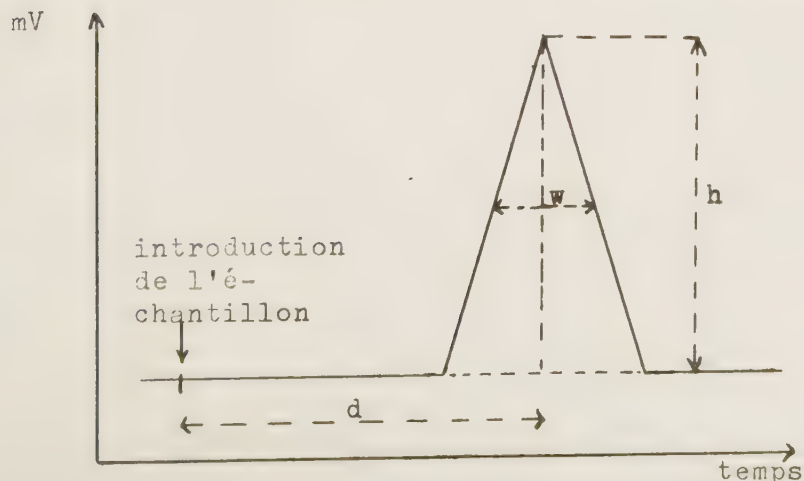
$$1,34 \cdot 10^6 \frac{\text{mV}}{\text{m moles / mn}}$$

Les composés minéraux, tels que l'hydrogène, l'azote, le gaz carbonique ou l'eau, qui ne sont pas ionisés, ne sont pas détectés. Cette particularité nous a permis de travailler en solution aqueuse, ce qui simplifie considérablement la technique.

L'électromètre permet d'amplifier le courant. Sa sensibilité est de $4 \cdot 10^{-12}$ ampères, minimum requis pour engendrer une déviation de 1 mV sur l'enregistreur. L'amplificateur est linéaire de $4 \cdot 10^{-14}$ à $1 \cdot 10^{-5}$ ampères. Compte-tenu de la sensibilité du détecteur et du taux des phénols urinaires, le courant de sortie de l'électromètre doit être atténué de 16 à 128 fois, ce qui permet de travailler au delà des possibilités maxima du détecteur.

I.5. L'ENREGISTREUR :

L'enregistreur utilisé est de type potentiométrique, d'échelle 0 - 1 mV. Le type de réponse fournie par l'enregistreur et les informations que l'on peut tirer des chromatogrammes sont représentés par le schéma suivant :



d : temps de rétention en mn, ou distance de rétention en mm.

h : hauteur du pic, en mm.

w : largeur du pic à mi-hauteur, en mm.

CHROMATOGRAPHE		F et M 810 - 19		
GAZ VECTEUR		Azote préchauffé à 220°.		
INJECTEUR	température	220°		
	tube d'injection	matériau : verre pyrex longueur : 80 mm diamètre : ext. = 6 mm ; int. = 2 mm.		
COLONNES	colonne	matériau : verre pyrex longueur : 2,30 m. diamètre : ext. = 6 mm ; int. = 4,5 mm.		
	phases stationnaires	support : aéropak 30 granulométrie : 100 - 120 meshs.		
		phases	carbowax 20M	SE 30
		imprégnation P/P	1 %	7 %
		température	150°	140°
		débit du gaz vecteur	75 ml/mn	50 ml/mn
		plateaux théoriques	3000	2150
		HEPT	0,766 mm	1,073 mm
DETECTEUR	type	ionisation de flamme		
	température	220°		
	sensibilité	$1,34 \cdot 10^6 \frac{\text{mV}}{\text{m mole / mn}}$		
ELECTROMETRE	sensibilité	maximum : $4 \cdot 10^{-12}$ ampères		
	linéarité	de $4 \cdot 10^{-14}$ à 10^{-15} ampères		
	atténuation	entrée : 1 sortie : 16 à 128		
ENREGISTREUR	marque	HONEYWELL - MINNEAPOLIS		
	utilisation	échelle : 0 - 1 mV		
	papier	vitesse de déroulement : 1,27 cm/mn.		

TABLEAU N° 3

La surface du pic (S) est assimilée à la surface d'un triangle, donc :

$$S = h \times w$$

Le temps de rétention est constant pour un composé déterminé, dans les conditions définies de température et de débit du gaz vecteur, ce qui permet la caractérisation.

De plus, la réponse du détecteur étant proportionnelle à la concentration instantanée dans le flux de la colonne, la surface du pic est proportionnelle à la quantité de corps injecté. Ceci permet l'analyse quantitative. (Tableau n° 3).

II. LA TECHNIQUE :

Nous avons choisi la technique de l'étalon interne, aussi bien pour l'analyse qualitative que pour l'analyse quantitative.

II.1. PRINCIPE ET AVANTAGES DE L'ETALON INTERNE :

Un composé étalon est ajouté en quantité connue au mélange à doser. Sur le chromatogramme obtenu, le rapport des temps de rétention : $\frac{\text{constituant}}{\text{étalon}}$ est caractéristique du constituant, ce qui permet ultérieurement l'identification.

En général, ce rapport dépend seulement de la température et du type de phase stationnaire utilisée. Cette méthode de caractérisation présente l'avantage d'être comparative et est d'une utilisation commode. de plus, le rapport des surfaces des pics $\frac{\text{constituant}}{\text{étalon}}$ est proportionnel au rapport des concentrations des deux composés. La surface du pic de référence sera donc utilisée pour étalonner la réponse du détecteur. Ce type de méthode présente deux avantages :

- la quantité injectée n'a pas besoin d'être mesurée de façon précise ;

- l'étalonnage en valeur absolue du détecteur n'est pas nécessaire, et les variations de sensibilité sont sans influence sur les résultats, dans la mesure où elles ne se manifestent pas au cours de l'analyse.

II.2. CHOIX DE L'ÉTALON INTERNE :

Ce choix est conditionné par différentes considérations :

- ne pas être un constituant normal de l'urine (sinon erreur entre la quantité introduite et la réponse du détecteur) ;
- ne doit pas interférer avec les composés présents ;
- être élué correctement dans les conditions fixées, ceci dans un temps proche des autres constituants ;
- si possible, avoir une structure voisine de celle des composés étudiés.

Compte-tenu de ces conditions, après de nombreux essais, nous avons sélectionné le para-méthoxy phénol, pour la colonne de carbowax 20M, et le thymol pour celle de SE 30.

II.3. PROCÉDURE :

L'urine étant un milieu aqueux, les étalons internes sont ajoutés sous forme de solution dans l'eau distillée. Les concentrations utilisées sont :

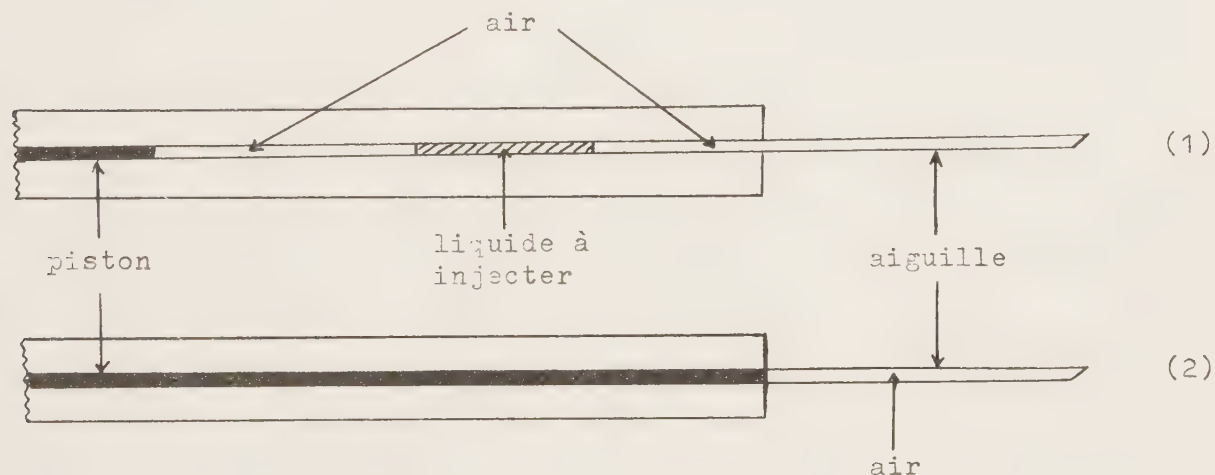
- 1 g/litre, pour le para-méthoxy phénol,
- 0,5 g/litre, pour le thymol.

Les solutions étalons obtenues sont ajoutées à l'échantillon à doser (urines avant et après hydrolyse), dans les proportions suivantes :

Echantillon à doser	4,5 ml
solution étalon	0,5 ml

La concentration finale de l'étalon interne dans la solution injectée est alors de 100 mg/litre, pour le para-méthoxy phénol, et 50 mg/litre, pour le thymol. Ces concentrations sont proches de celles trouvées pour les phénols urinaires après exposition aux hydrocarbures benzéniques.

L'introduction des échantillons est réalisée au moyen d'une seringue, en utilisant une technique qui permet d'éliminer l'erreur au volume de l'aiguille et décrite par le schéma suivant :



Position 1 : remplissage de la seringue. Le volume de liquide compris entre 2 "bulles" d'air est parfaitement déterminé.

Position 2 : après injection. Tout le liquide prélevé est chassé hors de la seringue.

II.4. L'HYDROLYSE :

Nous avons utilisé l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique en présence de chlorure de baryum. Elle est réalisée comme suit : dans un ballon en verre pyrex de 50 ml, adaptable sous un réfrigérant à reflux (à boule), de longueur 70 cm, mesurer :

urines	25 ml
HCl concentré (10 N)	1 ml
solution aqueuse de chlorure de baryum,	
saturée à chaud	5 ml

Ajouter 3 à 4 billes de verre et chauffer à ébullition pendant 1 heure sous le réfrigérant. Laisser décanter le précipité formé en maintenant le ballon sous le réfrigérant jusqu'à refroidissement (environ 30 minutes). Prélever le surnageant pour la chromatographie.

III. ANALYSE QUALITATIVE :

III.1. CONDITIONS D'IDENTIFICATION : ETALONNAGE.

Les données de rétention caractéristiques de chaque phénol sont obtenues par la détermination des temps de rétention relatifs. Ceux-ci sont calculés à partir des distances de rétention des phénols et de l'étalon interne, en utilisant la relation :

$$d_R^R = \frac{d_R^x}{d_R^E}$$

d_R^R : distance de rétention relative

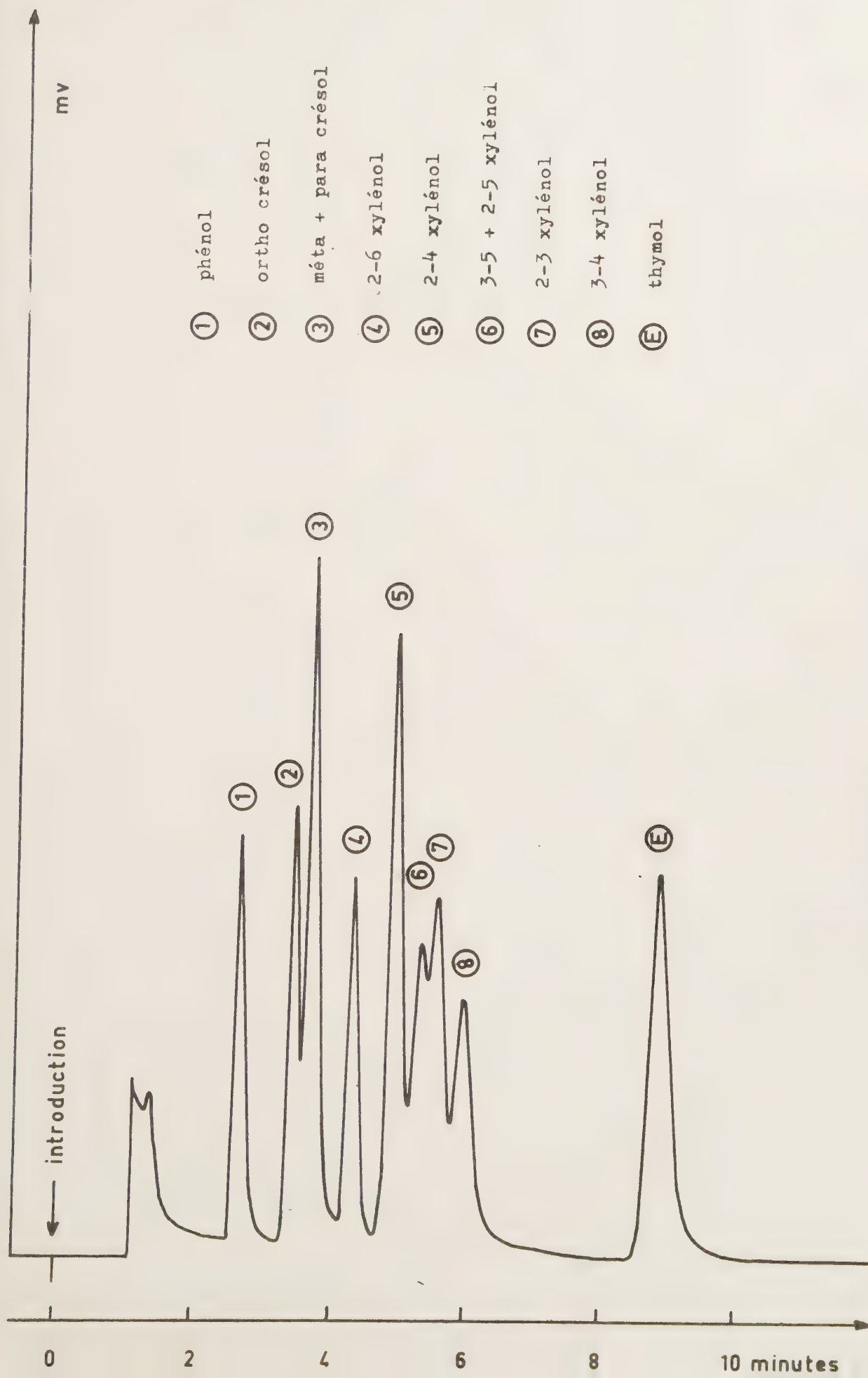
d_R^x : distance de rétention d'un constituant

d_R^E : distance de rétention de l'étalon interne.

Chaque phénol est analysé en association avec l'étalon interne sur chacune des colonnes, puis mélangé à l'ensemble des autres phénols pour vérifier la reproductibilité des données obtenues.

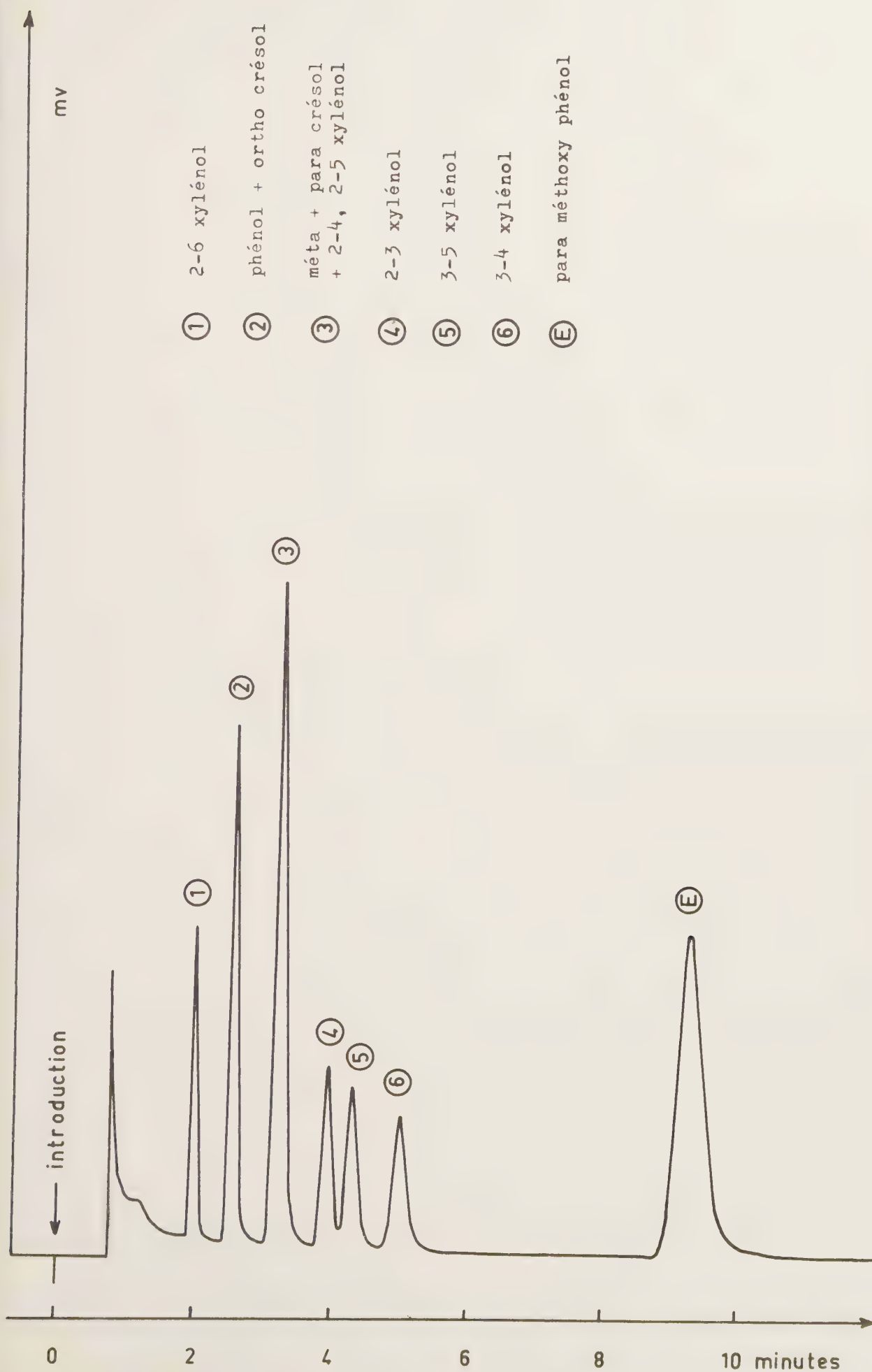
III.2. ETUDE DE LA SEPARATION :

Les chromatogrammes 1 et 2 montrent les séparations obtenues à partir des solutions étalons sur carbowax 20W et sur SE 30. L'étude des chromatogrammes montre que :



CHROMATOGRAMME 1 : PHENOLS EN SOLUTIONS AQUEUSES

(colonne : SE 30 à 7 %)



CHROMATOGRAMME 2 : PHENOLS EN SOLUTIONS AQUEUSES

(colonne : Carbowax 20M à 1 %)

- sur carbowax 20 M : phénol et ortho-crésol d'une part, méta, para-crésols, 2-4 et 2-5 xylénols d'autre part, ne sont pas séparés mais que les pics obtenus sont complètement séparés ;
- sur SE 30 : seuls le méta et le para-crésols d'une part, et le 2-5 et le 3-5 xylénols d'autre part, ne sont pas séparés. Les pics obtenus, sans être complètement résolus, sont suffisamment séparés pour permettre leur caractérisation.

L'étude chromatographique sur les deux colonnes permet de caractériser sans ambiguïté tous les phénols sauf le méta et le para-crésols toujours élués simultanément, et le 2-5 xylénol.

III.3. REPRODUCTIBILITE :

Cinq injections successives d'un mélange des phénols ont été réalisées. Les résultats sont consignés dans le tableau n° 4.

La dispersion moyenne des résultats (valeur moyenne $\pm$ écart type) est de :

$$V_m \pm 2 \% \text{ sur carbowax 20 M}$$

$$V_m \pm 3 \% \text{ sur SE 30.}$$

Cette dispersion des résultats est due à l'erreur sur la mesure des distances de rétention. En effet, l'écart maximum entre les valeurs extrêmes pour un même composé est de 0,5 mm, précision normale de la méthode de mesure utilisée.

IV. ANALYSE QUANTITATIVE :

La colonne de carbowax 20M permettant une meilleure séparation

COLONNE	SE 30							
PHÉNOLS x 10 ⁻³	PHENOL	CRESOLS		XYLENOLS				
ISOMERES		ORTHO	META PARA	2-6	2-4	2-5,3-5	2-3	3-4
DISTANCE DE RETENTION RELATIVE	297	386	417	488	555	600	626	671
	279	363	392	468	535	583	607	655
	326	407	440	510	561	614	648	684
	324	409	455	510	564	617	643	680
	300	384	411	482	548	592	615	659
MOYENNE	305	389	419	491	558	601	627	669
VARIANCE	0,313	0,283	0,305	0,268	0,284	0,166	0,248	0,129
ECART TYPE	17	16	17	16	16	13	15	11
ERREUR SUR LA MOYENNE	7	7	7	7	7	6	7	5

COLONNE	CARBOWAX 20 M							
PHÉNOLS x 10 ⁻³	PHENOL	CRESOL	CRESOLS	XYLENOLS	XYLENOLS			
ISOMERES		ORTHO	META PARA	2-4, 2-5	2-6	2-3	3-5	3-4
DISTANCE DE RETENTION RELATIVE	278		347		217	426	465	543
	297		359		228	438	478	557
	278		356		223	438	474	547
	284		357		224	440	477	550
	305		368		242	449	484	565
MOYENNE	285		357		226	438	475	552
VARIANCE	0,084		0,045		0,070	0,054	0,039	0,078
ECART TYPE	9		6		8	7	6	8
ERREUR SUR LA MOYENNE	4		3		5	3	2	3

TABLEAU N° 4 : RESULTATS TROUVES

ET REPRODUCTIBILITE DES DISTANCES DE RETENTION RELATIVE.

et une étude plus facile des chromatogrammes, nous l'avons utilisée pour effectuer les dosages systématiques. Nous avons vu que pour la méthode de l'étalon interne, il existe une proportionnalité entre le rapport des concentrations et celui des surfaces des pics correspondants. Cette proportionnalité est exprimée par la relation :

$$\frac{M_x}{M_E} = \alpha \frac{S_x}{S_E}$$

M_x : concentration du constituant à doser ;

M_E : concentration de l'étalon interne ;

S_x : surface du pic du constituant à doser ;

S_E : surface du pic de l'étalon interne ;

α ; sensibilité du détecteur pour le constituant dosé.

Cette relation peut s'écrire :

$$M_x = \alpha \cdot M_E \cdot \frac{S_x}{S_E}$$

α et M_E étant constants pour un constituant, la relation est de la forme $y = ax$, dont la représentation graphique est une droite passant par l'origine des coordonnées. La connaissance de M_x et la détermination de $R = \frac{S_x}{S_E}$ permettent de tracer une droite étalon pour chaque constituant avec M_x en abscisse et $R = \frac{S_x}{S_E}$ en ordonnée. Ultérieurement, la détermination du rapport R permet de déterminer la concentration inconnue d'un constituant.

IV.1. ANALYSES AVEC DES COURBES D'ETALONNAGE :

Les courbes d'étalonnage ont été effectuées avec le phénol, le para-crésol et le 3-5 xylénol, composés présents dans les urines nor-

males. De plus, une étude de la réponse du détecteur nous a confirmé qu'avec un détecteur à ionisation de flamme les isomères d'un composé ont sensiblement le même coefficient de réponse. Les résultats obtenus sont contenus dans le tableau n° 5.

colonne	carbowax 20 M								
composés	crésols			xylénols					
isomères	ortho	méta	para	2-3	2-4	2-5	2-6	3-4	3-5
$R = \frac{Cx}{SE}$	1,07	1,09	1,04	1,30	1,23	1,22	1,20	1,30	1,25
moyenne	1,07			1,25					
concentration :				90 mg/litre					

TABEAU N° 5 :

REPONSE DU DETECTEUR POUR DES ISOMERES CRESOLS ET XYLENOLS.

Ces résultats, compte tenu de la précision de la méthode (paragraphe IV.2.), montrent qu'un étalonnage pour chaque type de mono-phénol est suffisant (non substitué, mono méthyl substitués, diméthyl substitués).

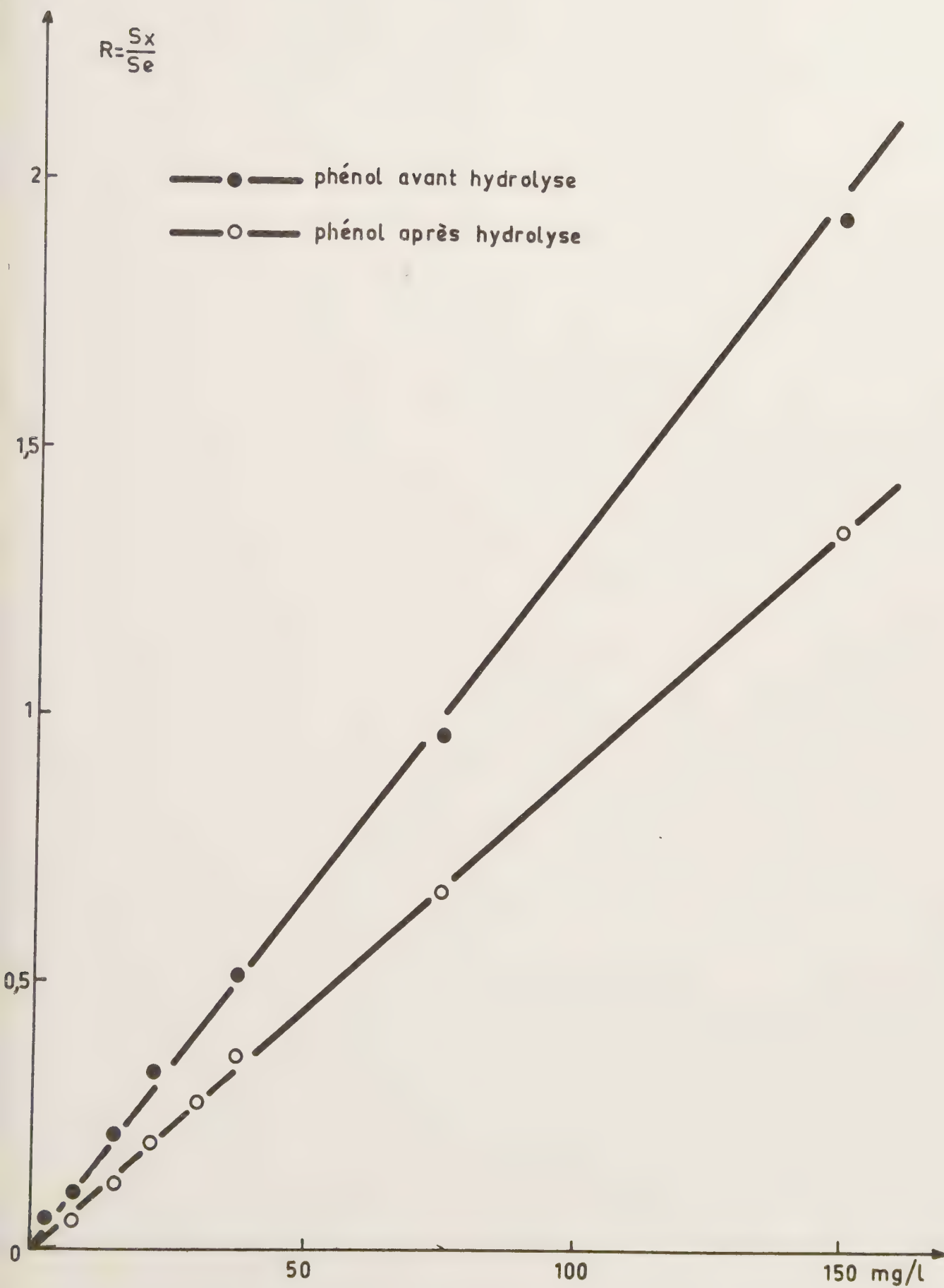
Pour établir les courbes d'étalonnage, une solution mère de phénol, para crésol, 3-5 xylénol est préparée dans les proportions suivantes :

DILUTIONS		1	2	3	4	5	6	7	8	9
SOLUTION MERE en ml		100	50	25	20	15	10	5	2	1
EAU DISTILLEE en ml		0	50	75	80	85	90	95	98	99
CONCENTRATION en mg/litre	PHENOL	150	75	37,5	30	22,5	15	7,5	3	1,5
	PARA CRESOL 3-5 XYLENOL	300	150	75	60	45	30	15	6	3

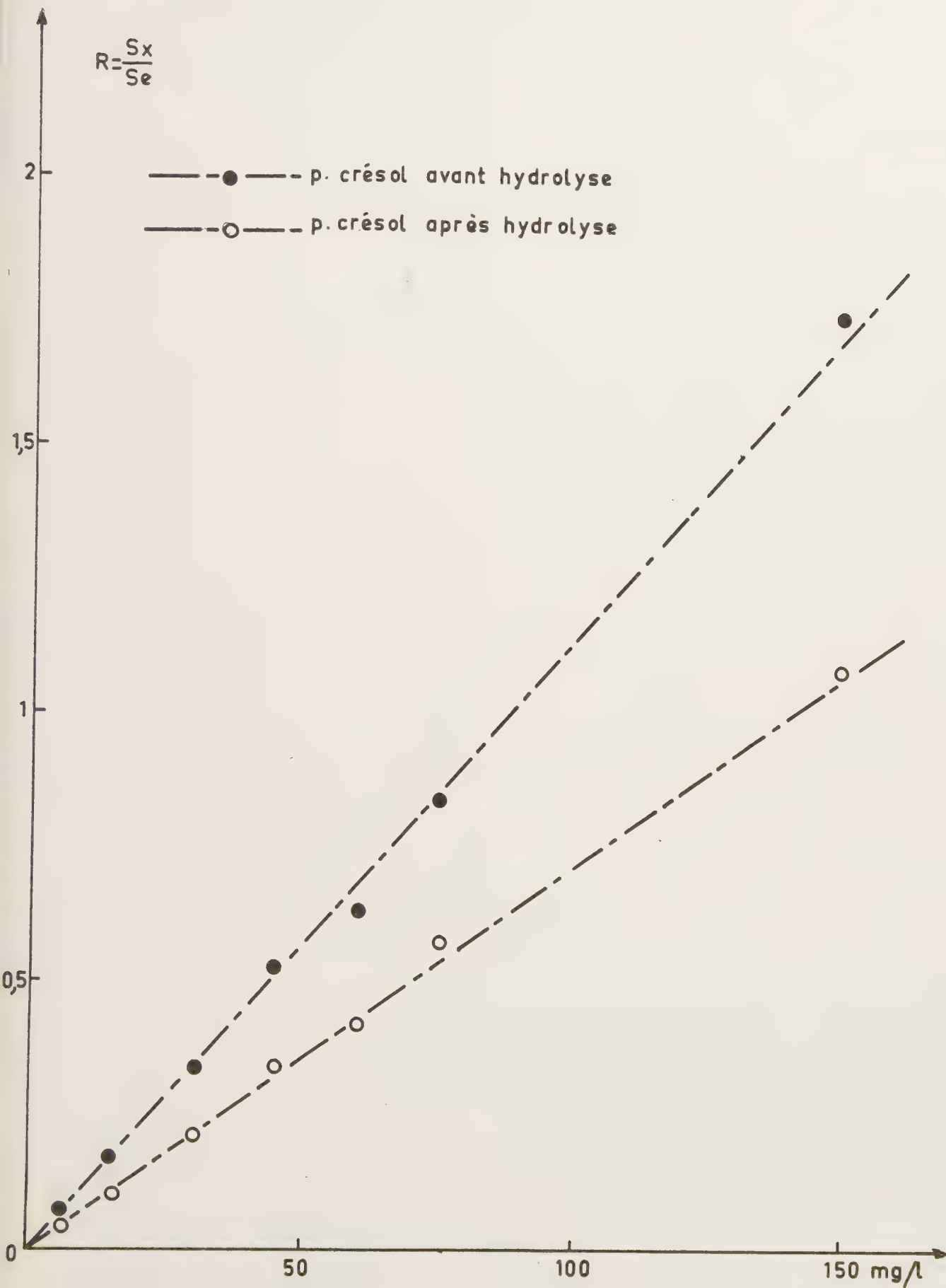
TABLEAU N° 6 : DILUTION DE LA SOLUTION MERE

RAPPORT $R = \frac{Sx}{SE}$						
COMPOSES	PHENOL		PARA CRESOL		3-5 XYLENOL	
HYDROLYSE	avant	après	avant	après	avant	après
DILUTION 1	1,944	1,352	3,089	2,172	3,651	1,896
DILUTION 2	0,965	0,676	1,755	1,085	1,855	0,981
DILUTION 3	0,512	0,360	0,840	0,578	0,958	0,484
DILUTION 4	0,360	0,275	0,629	0,425	0,742	0,393
DILUTION 5	0,328	0,197	0,525	0,342	0,614	0,280
DILUTION 6	0,212	0,124	0,341	0,210	0,396	0,182
DILUTION 7	0,109	0,055	0,172	0,104	0,191	0,095
DILUTION 8	0,060	0,020	0,075	0,044	0,083	0,039
DILUTION 9	0,028	0,012	0,035	0,017	0,040	0,022

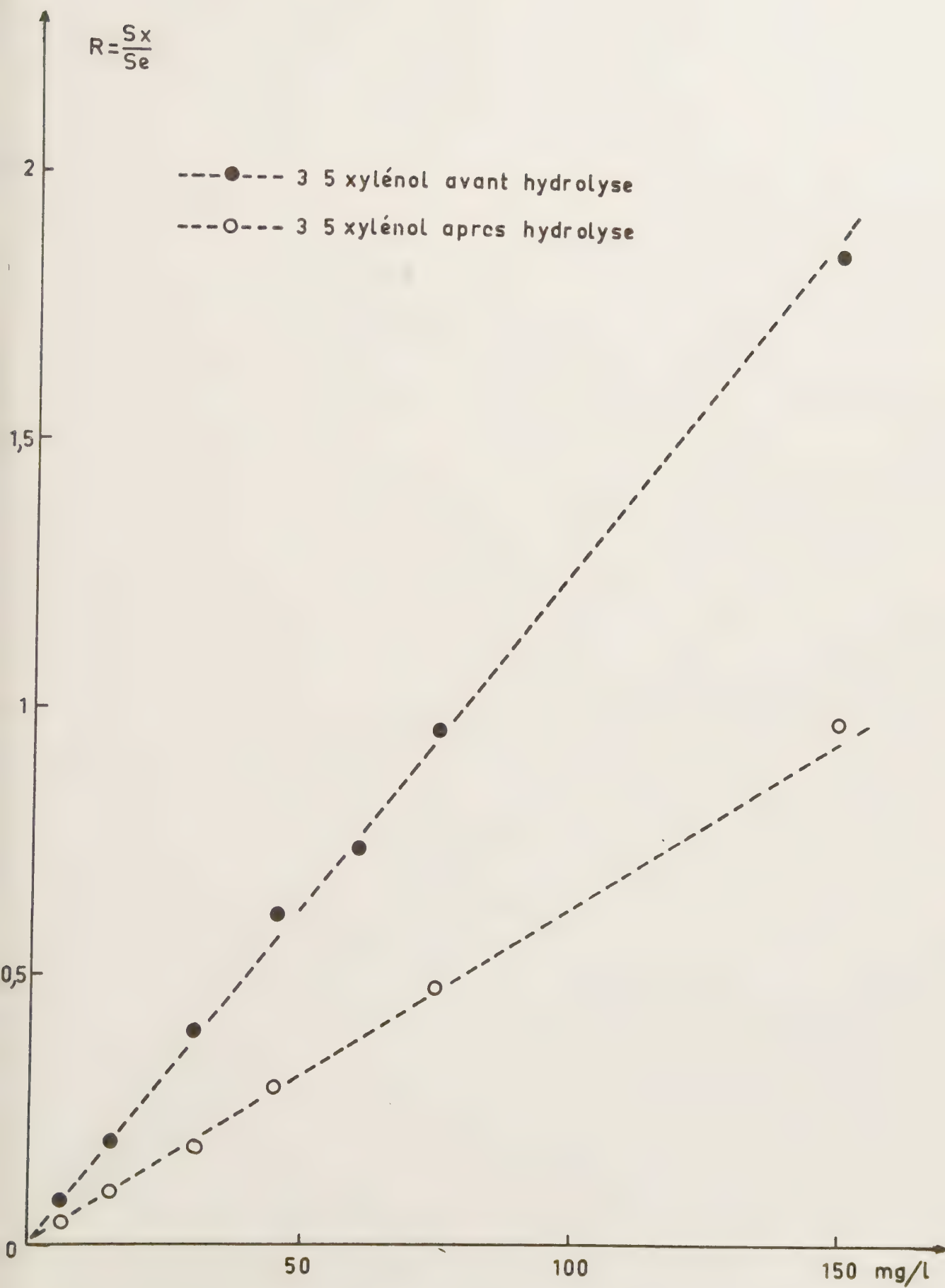
TABLEAU N° 7 : ETABLISSEMENT DES COURBES D'ETALONNAGE



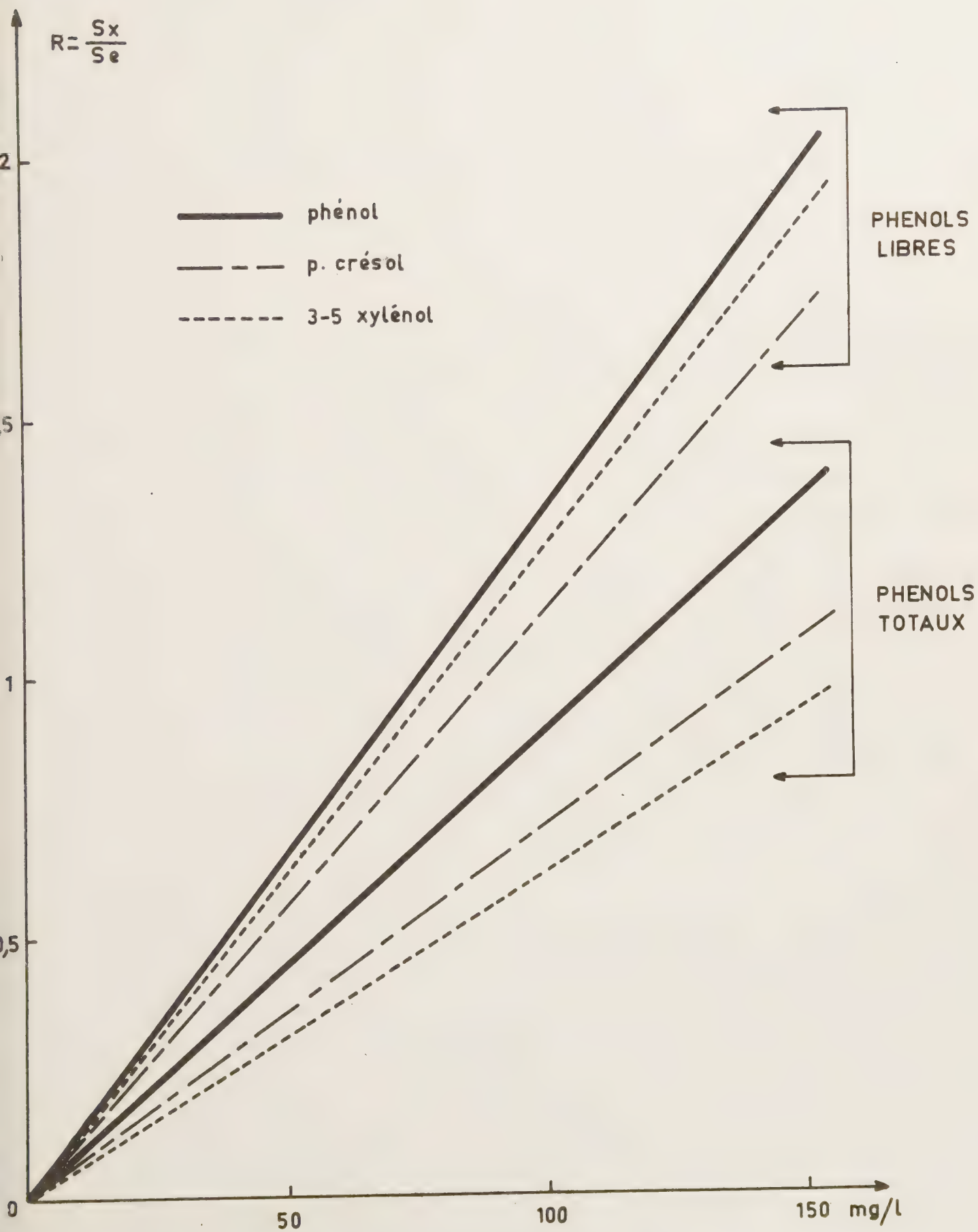
GRAPHE 1 : COURBES D'ETALONNAGE DU PHENOL



GRAPHE 2 : COURBES D'ETALONNAGE DES CRÉSOLS



GRAPHE 3 : COURBES D'ETALONNAGE DES XYLENOLS



GRAPHE 4 : COURBES D'ETALONNAGE REUNISSANT LES PRECEDENTES

phénol	150 mg
para crésol	300 mg
3-5 xylénol	300 mg
eau distillée	Q.s.p. 1000 ml

La solution mère est ensuite diluée pour obtenir une gamme de concentrations réparties suivant le tableau n° 6. Chaque dilution est ensuite chromatographiée avant et après hydrolyse. Les rapports $R = \frac{S_x}{S_E}$ sont calculés.

Les résultats représentant la moyenne de 4 essais sont consignés dans le tableau n° 7. Les courbes étalon en résultant sont représentées par les graphes 1, 2, 3, et réunies sur le graphe 4. La comparaison des droites sur le graphe 4 montre :

- pour les courbes obtenues avant hydrolyse, des pentes différentes pour le phénol, le para crésol et le 3-5 xylénol. Ceci est dû à la différence de réponse du détecteur vis à vis des composés.
- Après hydrolyse, une modification de la pente des droites, due pour une part à la dilution introduite, et à une perte systématique intervenant au cours de l'hydrolyse (cette perte est étudiée au paragraphe V.1.).

IV.2. PRECISION DE LA METHODE :

La mesure de la reproductibilité quantitative a été effectuée sur 10 injections d'une même solution aqueuse de phénol, para crésol et 3-5 xylénol.

Les résultats obtenus constituent le tableau n° 8.

PHENOLS x 10 ⁻³	PHENOL	PARA - CRESOL	3-5 XYLENOL
	313	515	515
	321	503	505
	322	519	513
	327	509	500
	312	502	498
	318	517	520
	321	514	514
	312	511	509
	309	505	505
	322	512	508
moyenne	318	511	509
variance	0,031	0,031	0,043
écart type	5,5	5,5	6,5
erreur sur la moyenne	1,6	1,6	2

TABLERAU N° 8 : PRECISION DE LA METHODE

La précision par rapport à la moyenne (VM) $\pm$ écart type, exprimée en pourcentage, est donc :

phénol : VM $\pm$ 1,7 %
para crésol : VM $\pm$ 1,1 %
3-5 xylénol : VM $\pm$ 1,3 %

Cette précision est satisfaisante pour un dosage par chromatographie en phase gazeuse.

V. ETUDE DES CONDITIONS EXPERIMENTALES :

Cette étude porte sur l'hydrolyse et sur l'influence du milieu sur les résultats quantitatifs.

V. 1. ETUDE DE L'HYDROLYSE :

Une série de dosages des phénols urinaires a été réalisée en ne tenant compte pour l'étalonnage que de la dilution introduite pour effectuer l'hydrolyse ; ces résultats ont montré que parfois le taux de phénols libres est supérieur à celui des phénols totaux, ce qui nous a conduit à envisager une perte intervenant lors de l'hydrolyse. Cette perte a été mise en évidence en effectuant les courbes d'étalonnage en solution aqueuse après hydrolyse.

V.1.1. Etude de la perte à l'hydrolyse :

- Les points de la courbe d'étalonnage après hydrolyse étant alignés, la perte doit être constante, en pourcentage, quelles que soient les concentrations en phénols des échantillons étudiés.

- La perte moyenne entraînée par l'hydrolyse est, en pourcentage :

sur le phénol	14 %
sur le crésol	14 %
sur le xylénol	26 %

- Cette perte, calculée pour une série d'essais effectués en solution aqueuse, a été retrouvée pour les urines et confirmée en comparant une hydrolyse enzymatique à l'hydrolyse chimique utilisée.

L'hydrolyse enzymatique a été effectuée par un suc d'hélix pomatia contenant une sulfatase et une glucuronidase. Le

suc est ajouté à l'urine dans les conditions suivantes :

urines 20 ml
tampon acétique pH 5,2 2 ml
suc d'hélix pomatia 1 ml

le tout est laissé 24 heures à 37°, puis chromatographié directement. Les taux en phénols sont lus sur la courbe des phénols avant hydrolyse, puis corrigés en fonction de la dilution introduite. Les résultats sont donnés par le tableau n° 9 pour le phénol et les crésols, les xylénols n'ayant pas été dosés car la concentration dans les urines testées était trop faible pour permettre une détermination valable.

COMPOSES		PHENOLS en mg/l		CRESOLS en mg/l	
hydrolyse		chimique	enzymatique	chimique	enzymatique
urines	1	6	5,8	61	60
	2	1,8	1,7	150	154
	3	3,6	3,4	112	115
	4	4,9	5	41	42
	5	4,5	4,4	75	73

TABLEAU N° 9

Les taux trouvés après hydrolyse chimique et enzymatique montrent que la perte observée en solution aqueuse se retrouve pour les dosages urinaires.

V.1.2. Etude de l'influence des facteurs de l'hydrolyse :

L'hydrolyse est régie par trois facteurs : la température, le pH (concentration en acide chlorhydrique) et la présence d'ions baryum. La substitution successive des différents réactifs par l'eau, et un dosage effectué avec ou sans chauffage, montrent l'action des différents facteurs de l'hydrolyse vis à vis de la perte observée. Les résultats trouvés constituent le tableau n° 10.

Les résultats montrent que la perte résulte essentiellement de :

- l'élévation de température,
- la présence d'ions baryum.

L'acide chlorhydrique ne semble pas intervenir directement dans la perte à l'hydrolyse, par contre il semble catalyser la réaction qui entraîne un déficit en présence d'ions baryum.

On peut formuler deux hypothèses sur le mécanisme de la réaction entraînant une perte, soit une réaction de dégradation (oxydation), soit admettre la formation d'ion phénate de baryum, qui ne sera pas volatilisé ou pyrrolysé au niveau de l'injecteur. Cela nous a conduit à envisager l'élimination des ions baryum pour la réaction d'hydrolyse. Un essai a été effectué sur l'urine et a conduit aux résultats du tableau n° 11. Ceux-ci montrent qu'à la concentration en acide utilisée (0,3 N), la présence d'ions baryum est nécessaire pour libérer les phénols conjugués. Si l'on amène la concentration en acide à une valeur de 0,4 N, on peut éviter l'utilisation des sels de baryum, mais les rendements ne sont pas meilleurs. Malgré cela, nous avons conservé l'hydrolyse en présence d'ions baryum.

CONDITIONS OPERATOIRES				TAUX en mg/litre		
chauffage	eau distillée en ml	solution de BaCl ₂ en ml	HCl concentré en ml	phénol	p-crésol	3-5 xylénol
0	6	0	0	58	113	113
+	5	0	0	57,5	105	95
+	1	5	0	55	98	88
+	5	0	1	57	106	97
+	0	5	1	51,5	92	80

TABLEAU N° 10 :

ETUDE DE LA PERTE A L'HYDROLYSE EN MILIEU AQUEUX

CONDITIONS OPERATOIRES				TAUX en mg/litre		
chauffage	eau distillée en ml	solution de BaCl ₂ en ml	HCl concentré en ml	phénol	p-crésol	3-5 xylénol
+	0	5	1	5,8	23	1,7
+	5	0	1	4,2	19	1,5
+	0	0	1	5,2	23,5	1,7

TABLEAU N° 11 :

ETUDE DE LA PERTE A L'HYDROLYSE EN MILIEU URINAIRE

V.2. INFLUENCES DU MILIEU BIOLOGIQUE COMPLEXE SUR LES RESULTATS QUANTITATIFS :

Une épreuve de dosage a été effectuée en chargeant une rine par différentes concentrations en phénols analysés (tableau n° 13). La même épreuve est réalisée en remplaçant l'urine par l'eau. Les résultats constituent le tableau n° 14 et les graphes 5, 6 et 7.

La comparaison des graphes montre que le milieu, compte tenu des erreurs expérimentales, est pratiquement sans influence sur le dosage.

Le pourcentage de phénols ajoutés à l'urine et retrouvés après analyse varie de 88 à 107 %, selon le phénol (tableau n° 12).

	composés	quantité retrouvée en pourcentages
avant hydrolyse	phénol	95
	para-crésol	92
	3-5 xylénol	94
après hydrolyse	phénol	107
	para-crésol	88
	3-5 xylénol	96

TABLEAU N° 12

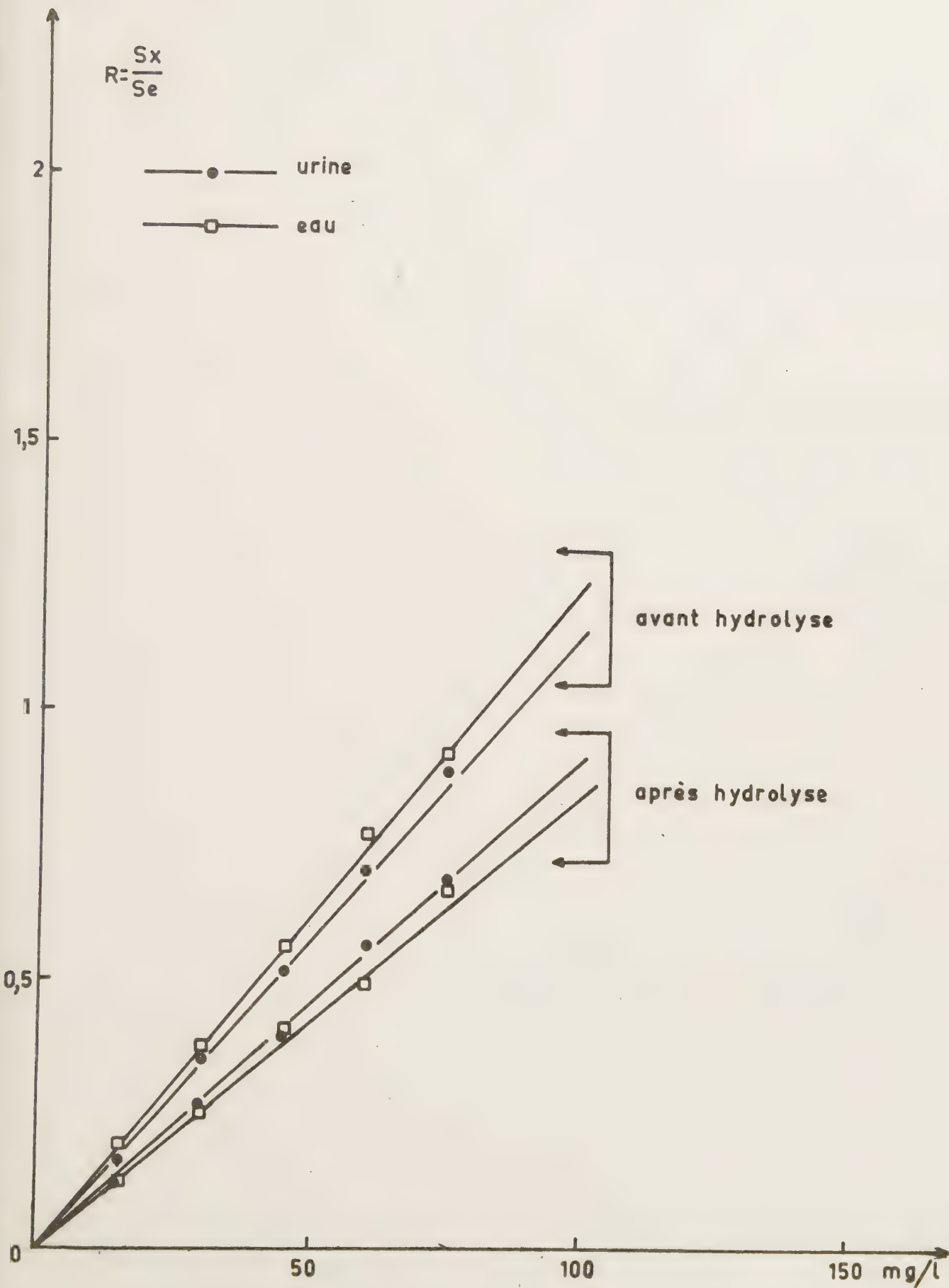
SOLUTION		1	2	3	4	5
urine ou eau (ml)		25	25	25	25	25
solution mère (ml)		5	10	15	20	25
eau (ml)		20	15	10	5	0
concentration (mg/litre)	phénol	15	30	45	60	75
	para-crésol 3-5 xylénol	30	60	90	120	150

TABLEAU N° 13 : DILUTION DE LA SOLUTION MERE

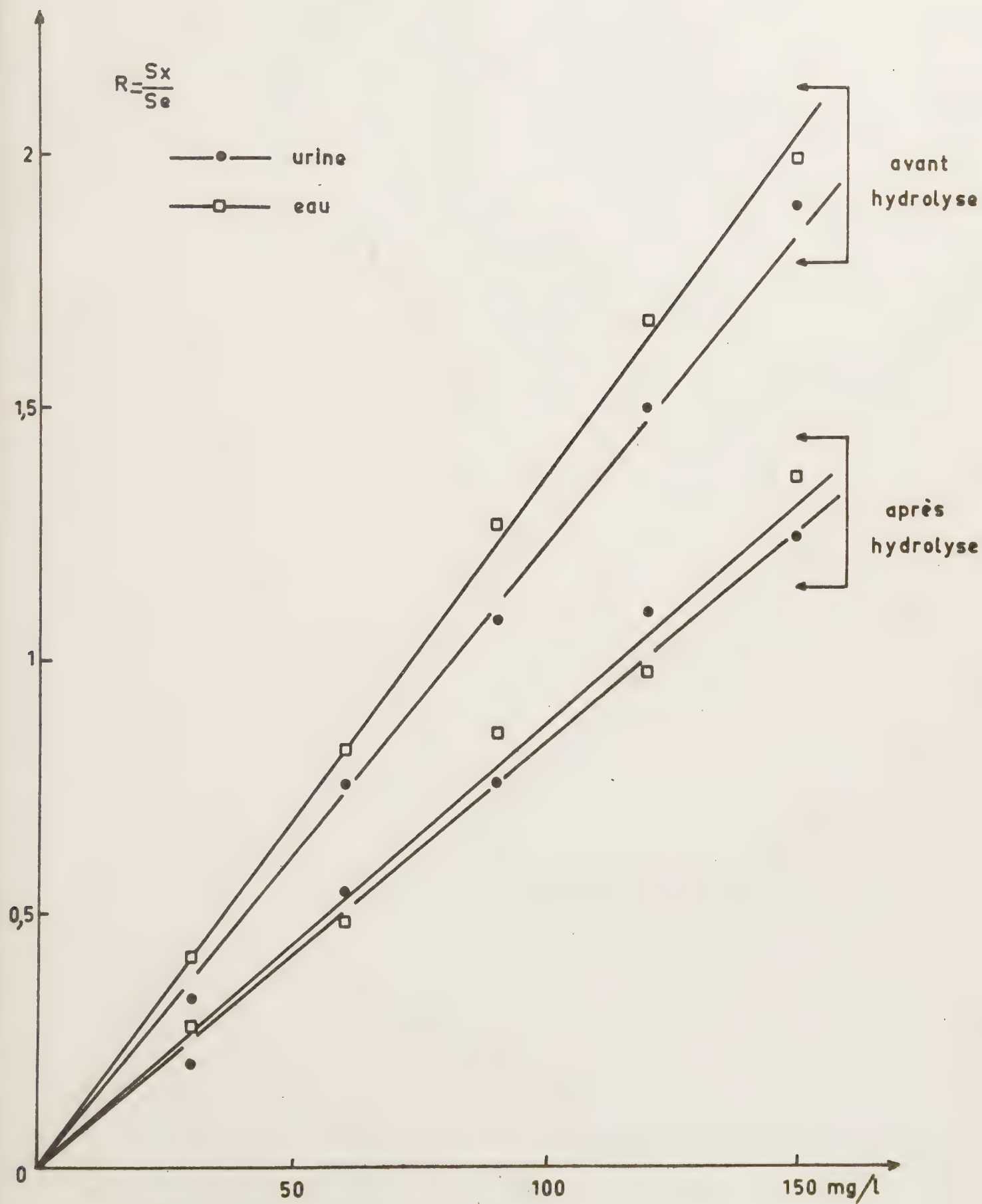
		avant hydrolyse					
composés		phénol		para-crésol		3-5 xylénol	
milieu		eau	urine	eau	urine	eau	urine
rapport $R = \frac{SE}{Sx}$	n°1	0,191	0,154	0,413	0,320	0,418	0,374
	2	0,374	0,350	0,821	0,748	0,827	0,790
	3	0,560	0,512	1,270	1,084	1,225	1,168
	4	0,757	0,705	1,685	1,506	1,690	1,540
	5	0,915	0,887	1,980	1,905	1,970	1,934

		après hydrolyse					
composés		phénol		para-crésol		3-5 xylénol	
milieu		eau	urine	eau	urine	eau	urine
rapport $R = \frac{SE}{Sx}$	n°1	0,132	0,120	0,275	0,203	0,265	0,185
	2	0,252	0,255	0,495	0,541	0,451	0,474
	3	0,410	0,390	0,860	0,767	0,720	,657
	4	0,493	0,564	0,925	1,105	0,900	1,050
	5	0,678	0,692	1,420	1,254	1,290	1,223

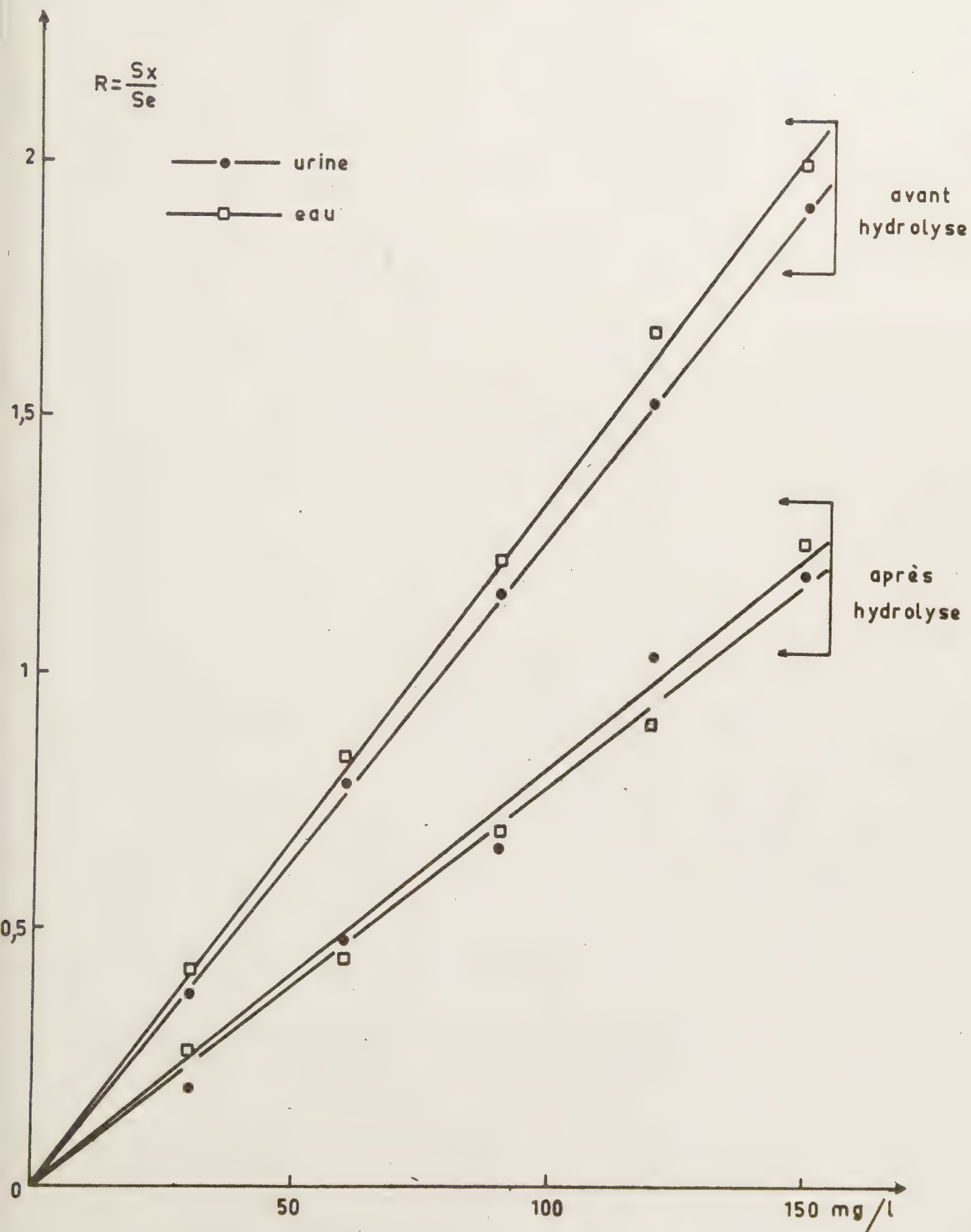
TABLEAU N° 14 : INFLUENCE DU MILIEU SUR LE DOSAGE



GRAPHE 5 : INFLUENCE DU MILIEU SUR LE DOSAGE DU PHENOL



GRAPHE 6 : INFLUENCE DU MILIEU SUR LE DOSAGE DES CRESOLS



GRAPHE 7 : INFLUENCE DU MILIEU SUR LE DOSAGE DES XYLENOLS

VI. APPLICATION A L'ANALYSE DES PHENOLS DANS LES URINES :

L'étalonnage effectué précédemment en solution aqueuse permet de caractériser et de doser les phénols urinaires.

VI.1. CARACTERISATION :

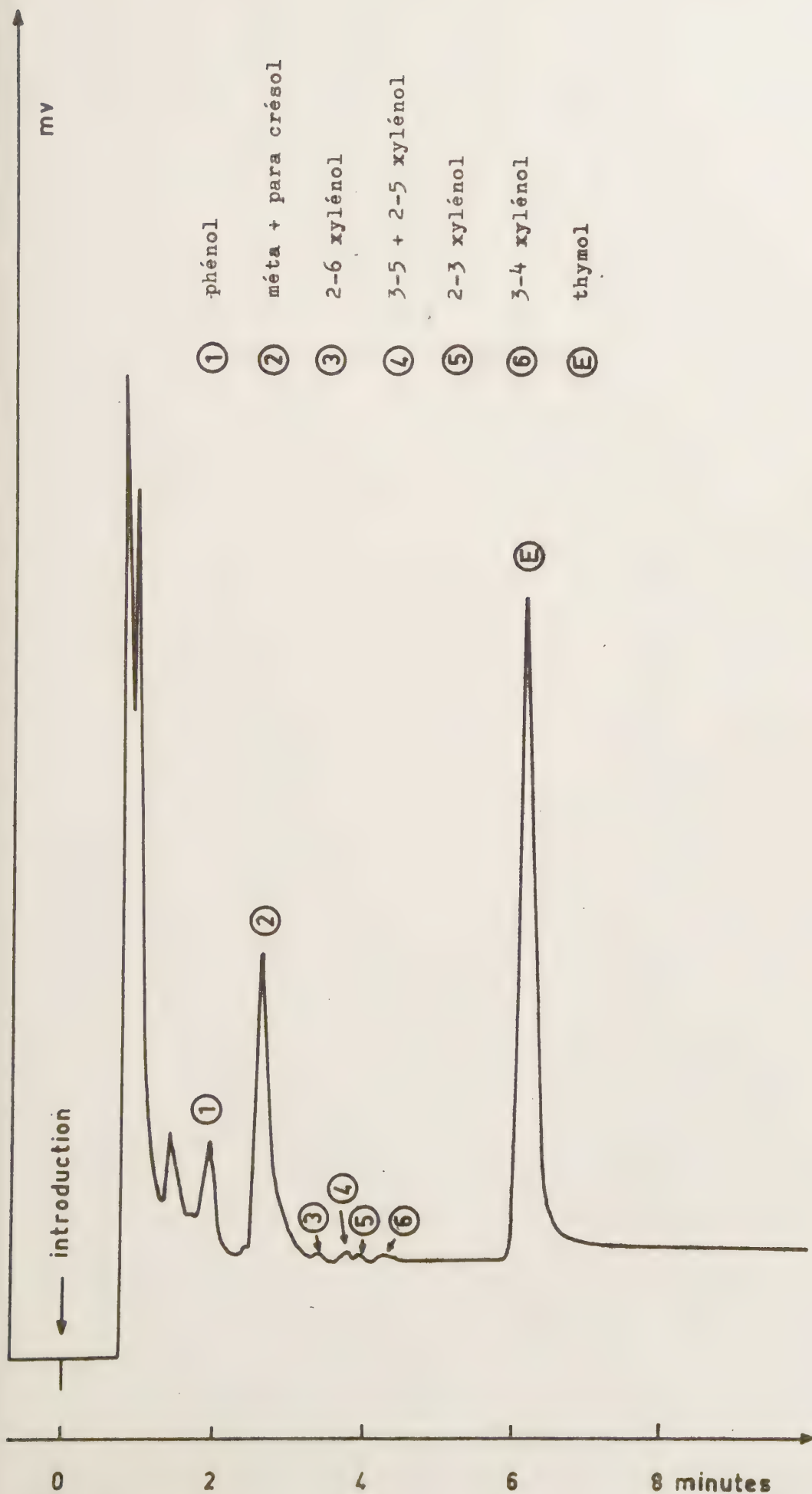
Les urines, chromatographiées sur les colonnes avant et après hydrolyse, conduisent à des graphes du type de ceux représentés par les chromatogrammes 3, 4, 5 et 6. La détermination des distances de rétention relative pour les pics obtenus ont donné les résultats du tableau n° 15.

colonnes		carbowax 20M		SE 30	
PHENOLS		libres	totaux	libres	totaux
distances de rétention relative	1	-	0,218	0,313	0,292
	2	0,292	0,296	0,425	0,405
	3	0,355	0,363	0,507	0,500
	4	0,439	0,436	0,594	0,590
	5	0,477	0,474	0,619	0,620
	6	0,556	0,560	0,671	0,666

TABLEAU N° 15 : CARACTERISATION DES PHENOLS URINAIRES

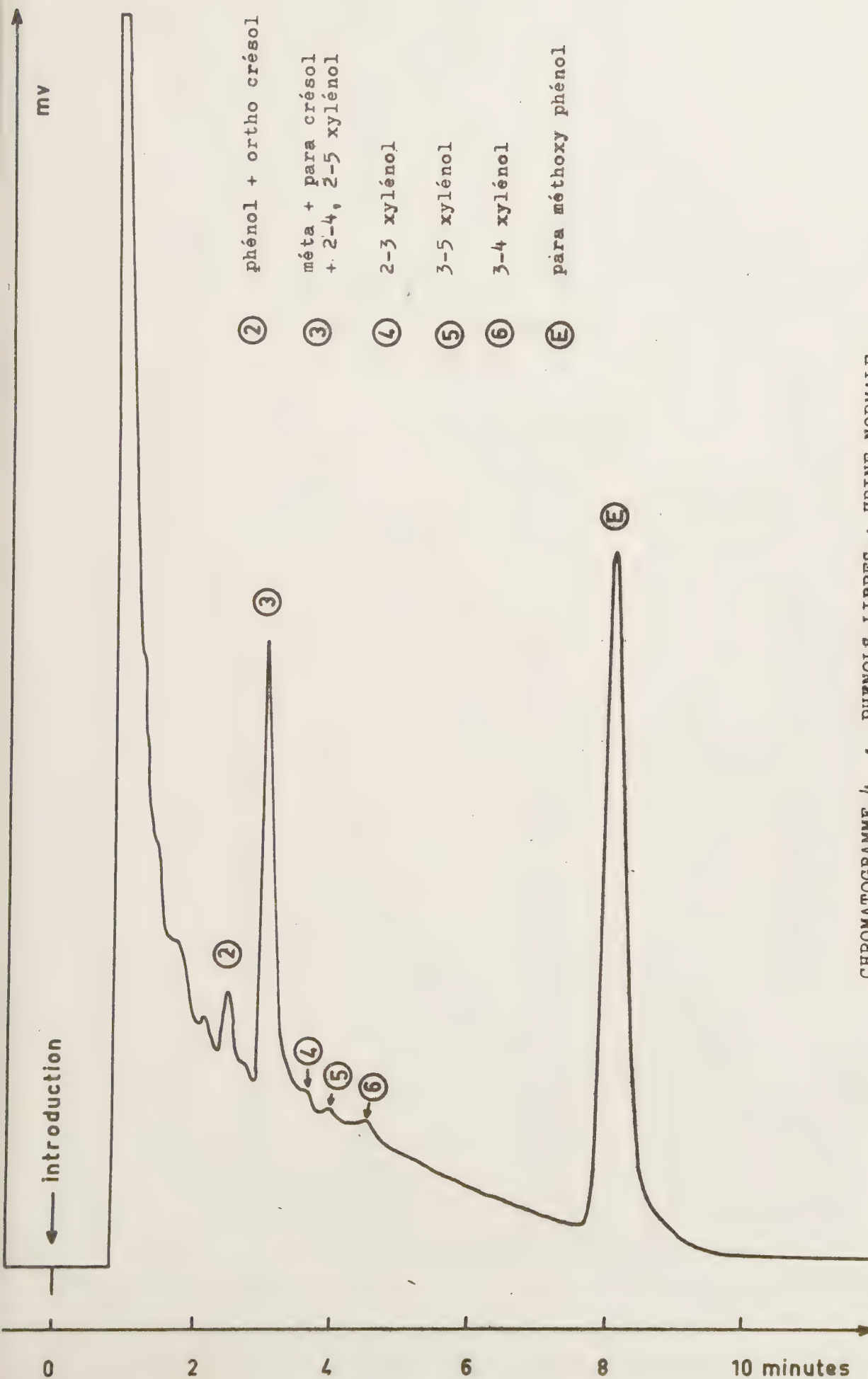
Ces résultats permettent de mettre en évidence dans l'urine la présence de :

- phénol,
- para crésol,
- 2-6, 3-5, 2-3 et 3-4 xylénols.



CHROMATOGRAMME 3 : PHENOLS LIBRES : URINE NORMALE

(colonne : SE 30 à 7 %)



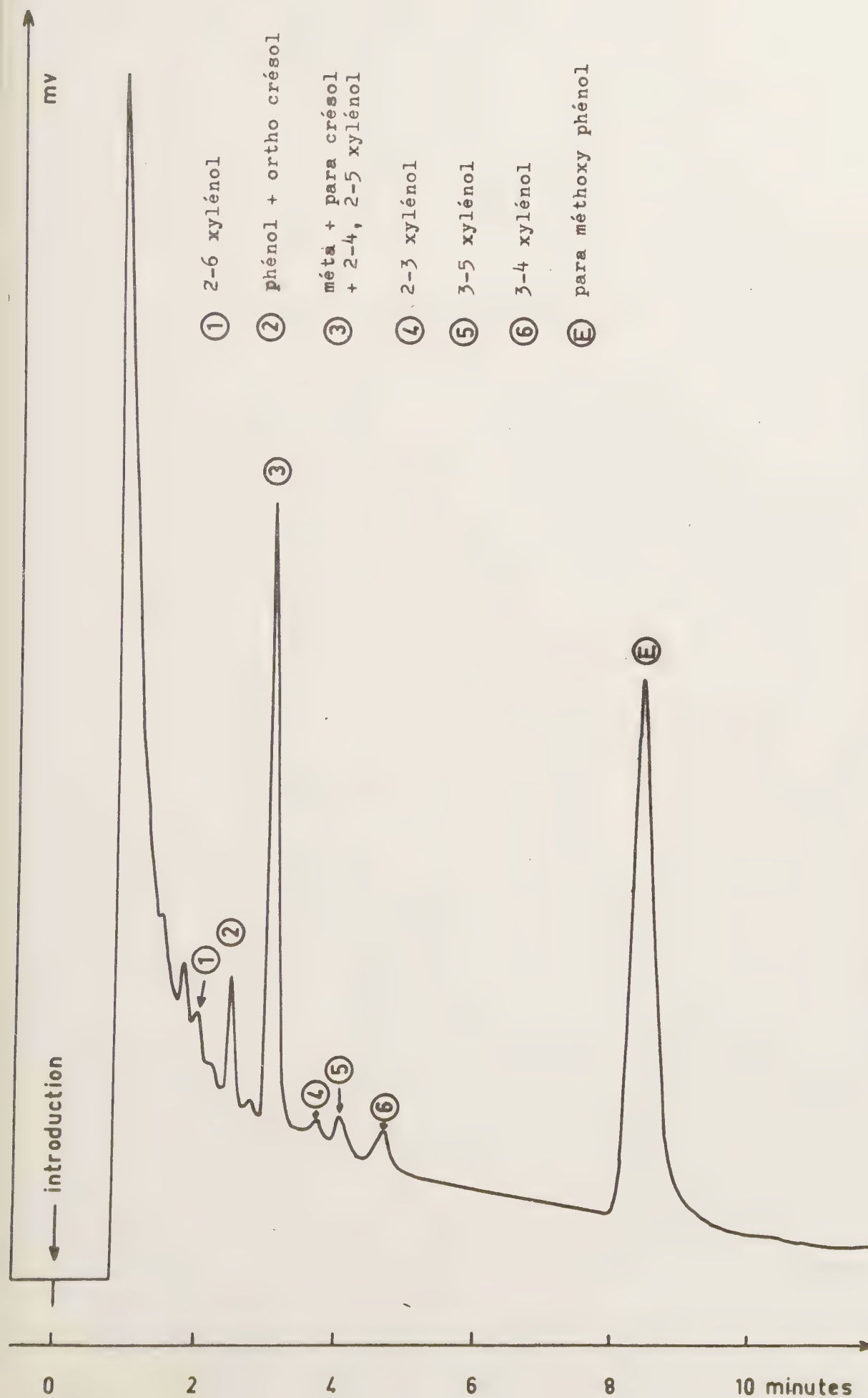
CHROMATOGRAMME 4 : PHÉNOLS LIBRES : URINE NORMALE

(colonne : Carbowax 20 M à 1 %)



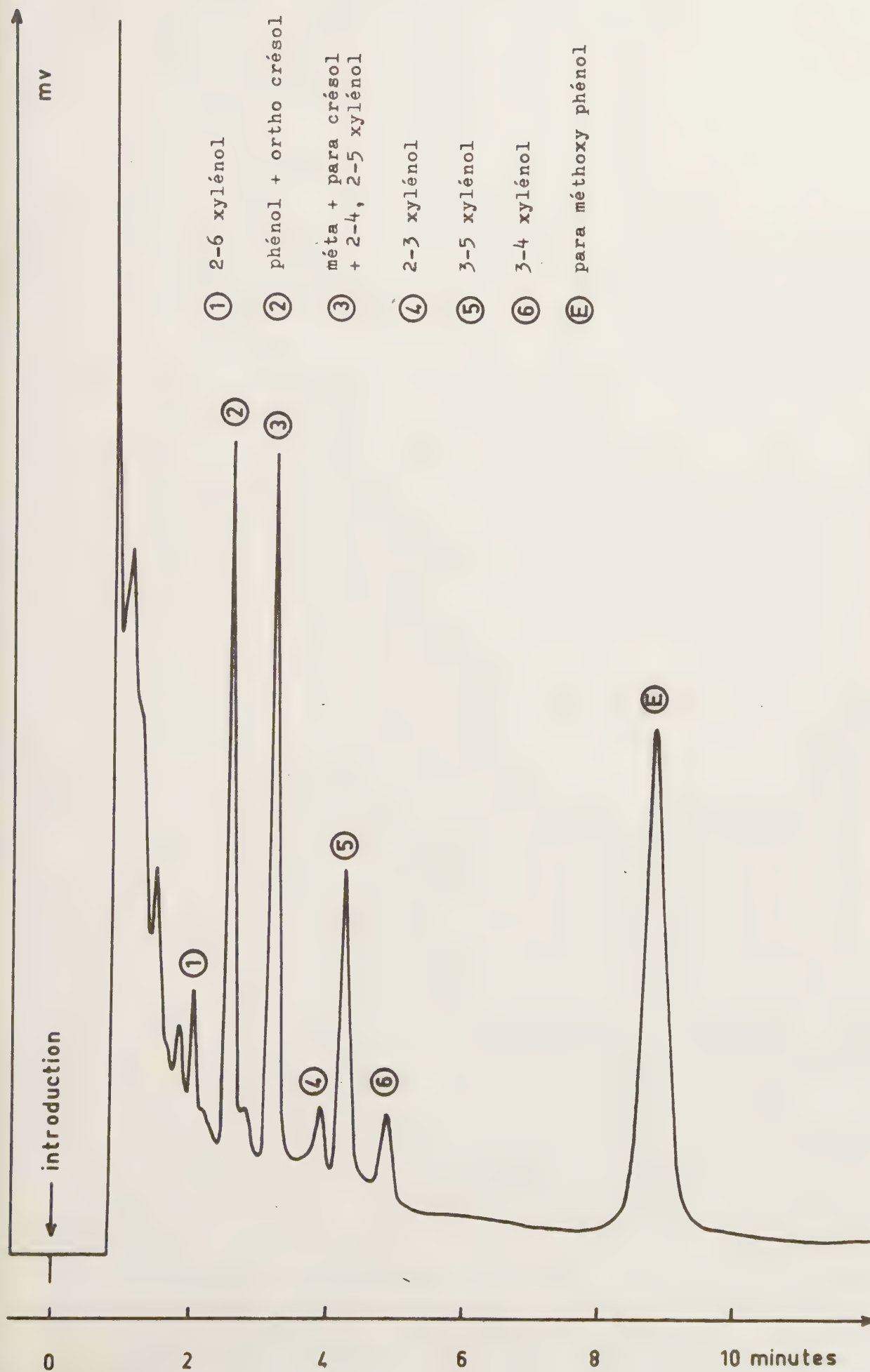
CHROMATOGRAMME 5 : PHENOLS TOTAUX : URINE NORMALE

(colonne : SE 30 à 7 %)



CHROMATOGRAMME 6 : PHENOLS TOTAUX : URINE NORMALE

(colonne : Carbowax 20 M à 1 %)



CHROMATOGRAMME 7 : PHENOLS TOTAUX : URINE
D'UN EXPOSE AU XYLENE COMMERCIAL + PHENOL.

(colonne : Carbowax 20 M à 1 %)

Il faut noter la présence possible du méta crésol et du 2-5 xylénol, confondus respectivement avec le para crésol et le 3-5 xylénol dans le système de colonnes utilisées. Mais les données de la littérature montrent qu'ils n'apparaissent sans doute pas dans les urines.

Le chromatogramme 7, obtenu à partir des urines d'un ouvrier exposé à la manipulation d'un mélange de xylène et de phénol, montre une augmentation significative du phénol et du 3-5 xylénol. Le xylène commercial manipulé contenait 50 % de meta xylène, ce qui explique la forte augmentation du 3-5 xylénol ; le phénol inhalé est éliminé directement dans les urines, ou sous forme conjuguée.

VI.2. DOSAGE :

Les échantillons d'urines doivent être conservés au réfrigérateur, à + 4°.

VI.2.1. Reproductibilité :

La reproductibilité du dosage a été déterminée en réalisant 5 essais en parallèle, à partir d'un même échantillon d'urine, avant et après hydrolyse.

Les résultats obtenus sont les suivants (tableau n° 16) :

La reproductibilité du dosage des xylénols est moins bonne que celle du phénol et des crésols, car, les taux étant faibles, l'erreur sur la mesure de la surface des pics est très grande.

phénols	libres			totaux		
en mg/litre	phénol	crésols	xylénols	phénol	crésols	xylénols
	3,8	16,5	0,36	12,6	52	1,3
	3,2	16,5	0,44	12,7	54	1,1
	3,6	19,0	0,44	12,3	52	1,5
	3,6	19,0	0,44	12,3	49	1,3
	3,9	19,0	0,36	12,1	50	1,5
moyenne (M)	3,6	18,0	0,40	12,4	51,5	1,35
variance	0,06	1,5	0,016	0,05	3,15	0,022
écart type (ET)	0,24	1,2	0,04	0,22	1,8	0,15
erreur sur la moyenne	0,10	0,6	0,018	0,10	0,8	0,7
variation M $\pm$ 1 ET	3,6 $\pm$ 0,2	18 $\pm$ 1,2	0,4 $\pm$ 0,04	12,4 $\pm$ 0,22	51,5 $\pm$ 1,8	1,35 $\pm$ 0,15
reproductibilité en % (M)	$\pm$ 6,5	$\pm$ 6,5	$\pm$ 10	$\pm$ 2	$\pm$ 3,5	$\pm$ 11

TABLEAU N° 16 :

REPRODUCTIBILITE DES DOSAGES DES PHENOLS URINAIRES

VI.2.2. Minimum de détection :

Le minimum de détection urinaire n'a pas été déterminé car il n'a pas d'intérêt pour l'exploitation de la méthode, compte-tenu des taux normalement présents dans les urines. Cependant, seuls les résultats supérieurs à 0,5 mg/litre sont pris en considération car, en dessous de cette valeur, les résultats ne sont plus significatifs.

VII. ETUDE CRITIQUE DE LA METHODE :

Les urines sont normalement des milieux très complexes et leur introduction directe dans le chromatographe représente une solution certainement critiquable. Cependant, nous avons adopté cette solution car l'étude bibliographique des différentes techniques proposées par ailleurs (chapitre 2) montre que les méthodes avec extraction ont des rendements souvent faibles et non reproductibles. En outre, l'injection directe des échantillons permet de disposer d'une technique rapide et les résultats obtenus montrent que la précision et la fidélité sont suffisantes pour son utilisation en biologie.

Du fait que nous avons dosé les phénols urinaires sur la colonne de carbowax 20M, les taux de phénol et de crésols sont théoriquement entachés d'une erreur. En effet, le phénol est élué en même temps que l'ortho-crésol, les crésols m et p avec les 2-5 et 2-4 xylénols. Cependant, les résultats des dosages urinaires montrent que les taux de phénol et de crésols ne sont pas augmentés significativement après inhalations respectives de toluène et de xylènes, une très faible partie du toluène étant éliminée sous forme d'ortho-crésol et des xylènes sous forme de 2-5 et 3-4 xylénols. Ces résultats peuvent être vérifiés sur une colonne de SE 30 où les phénol, crésols et xylénols, sont élués séparément, mais moins bien que sur la colonne de carbowax 20M.

VIII. RESULTATS :

Les dosages des phénols urinaires ont été effectués chez trois types de personnes :

- sujets témoins, non exposés aux hydrocarbures ;
- sujets exposés à un hydrocarbure benzénique connu, ce qui permet de déterminer le phénol éliminé spécifique de l'exposition ;
- sujets supposés exposés aux hydrocarbures benzéniques, pour étudier la valeur de dépistage de la méthode.

VIII.1. SUJETS TEMOINS :

Une étude préalable sur 40 hommes et 40 femmes ne montre pas de différence significative du taux des phénols urinaires entre les deux sexes. Une étude globale a donc été réalisée sur 130 témoins. Les résultats de l'étude statistique constituent le tableau 17.

en mg/litre	PHENOL		GRESOLS		XYLENOLS	
	libre	total	libres	totaux	libres	totaux
effectifs	130	130	130	130	130	130
moyenne	1,18	4,32	7,86	54,52	1,17	2,92
écart type	0,97	1,95	6,62	26,66	0,84	2,28
valeur maximum	4,90	12,10	42,00	117,00	4,00	11,70
valeur minimum	0,50	0,90	0,50	5,90	0,50	0,50
erreur sur la moyenne	0,08	0,17	0,58	2,33	0,10	0,20
intervalle de prédiction $M \pm 2 ET$	0 à 3,12	0,42 à 8,22	0 à 21,10	1,2 à 107,84	0 à 2,85	0 à 7,48

TABLEAU N° 17 : RESULTATS CHEZ LES TEMOINS

Le nombre important d'échantillons permet d'estimer des intervalles de prédiction (95 % des cas) pour chacun des paramètres. Malgré l'homogénéité clinique des sujets témoins (personnes de 20 à 40 ans), les distributions montrent une dispersion importante des résultats (figures n^{os} 7, 8 et 9). De plus, les répartitions ne sont pas de formes simples, seules celles des phénols libres apparaissent en forme de L.

VIII.2. SUJETS EXPOSES A UN RISQUE CONNU :

Les phénols urinaires ont été étudiés lors de quatre types d'expositions : benzène, toluène, xylènes et chlorobenzène.

VIII.2.1. Benzène :

64 déterminations ont été faites chez des personnes exposées à cet hydrocarbure. L'étude statistique des résultats globaux (tableau n° 18) montre une augmentation significative de la moyenne du phénol total, les crésols et les xylénols totaux restant au niveau des témoins.

en mg/litre	PHENOL		CRESOLS		XYLENOLS	
	libre	total	libres	totaux	libres	totaux
effectifs	64	64	64	64	53	62
moyenne	3,52	18,58	13,39	59,00	1,07	3,09
écart type	2,42	14,50	8,73	32,37	0,64	2,83
erreur sur la moyenne	0,30	1,81	1,09	4,04	0,08	0,35

TABLEAU N° 18 : RESULTATS GLOBAUX CHEZ LES SUJETS EXPOSES AU BENZENE

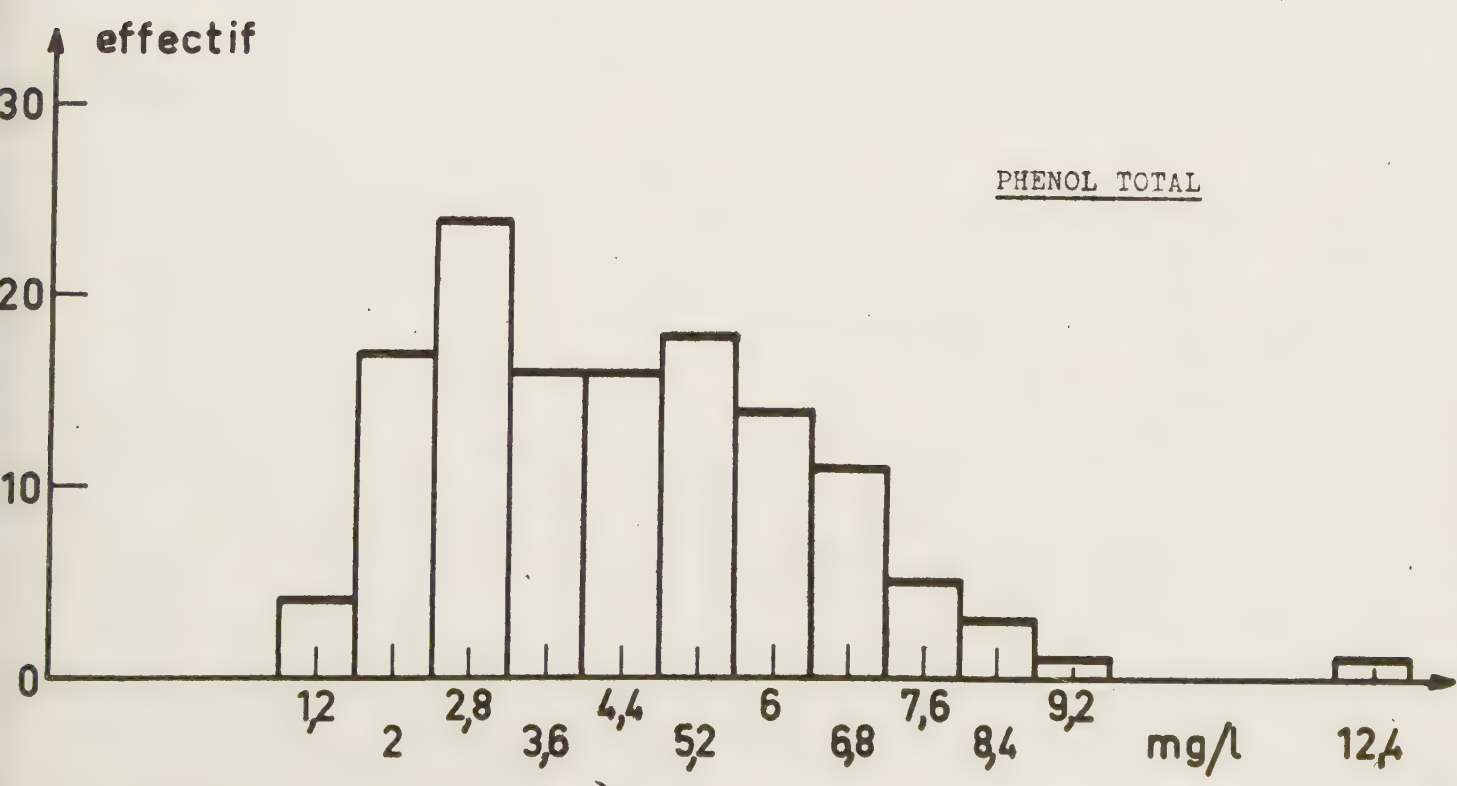
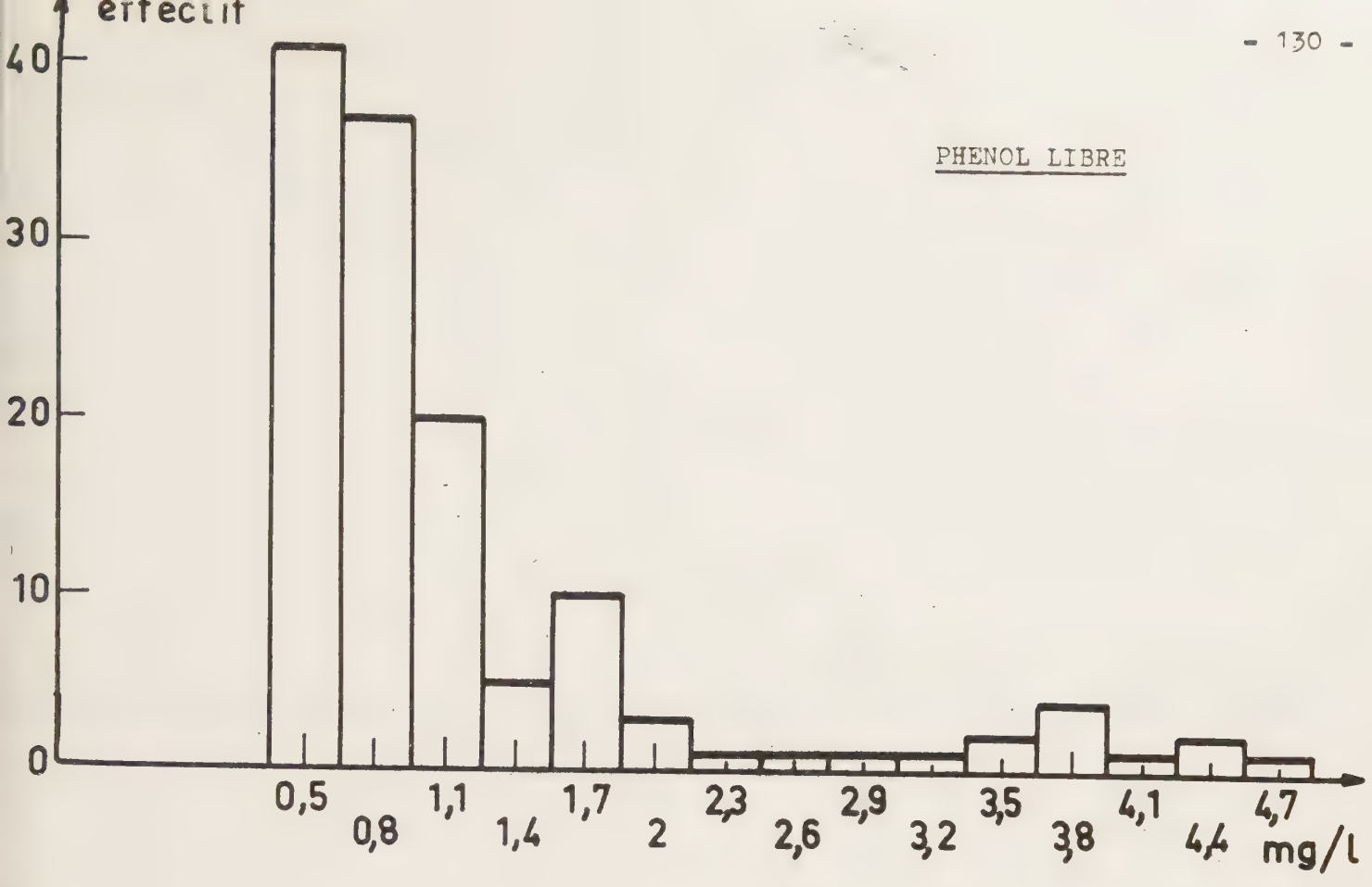


FIGURE N° 2 : REPARTITION DU PHENOL CHEZ LES TEMOINS

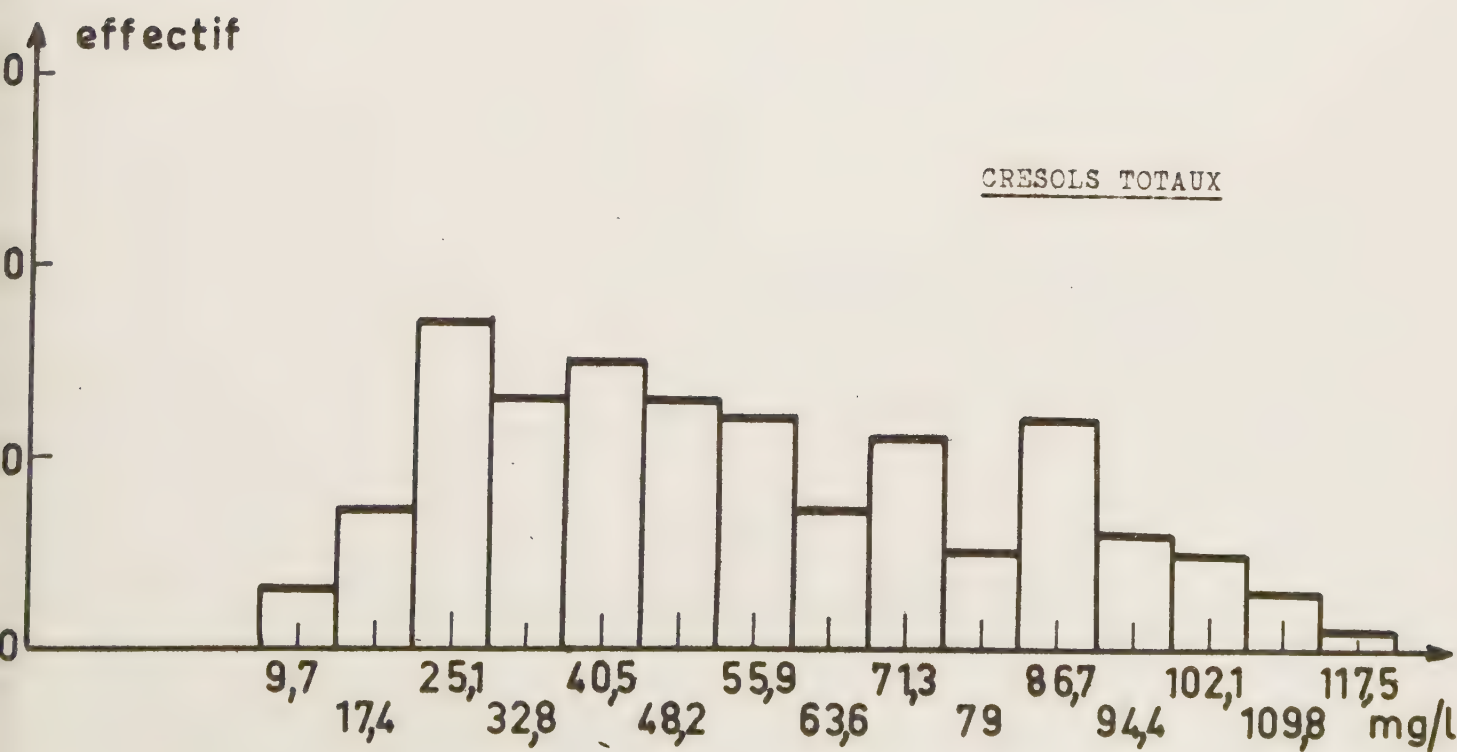
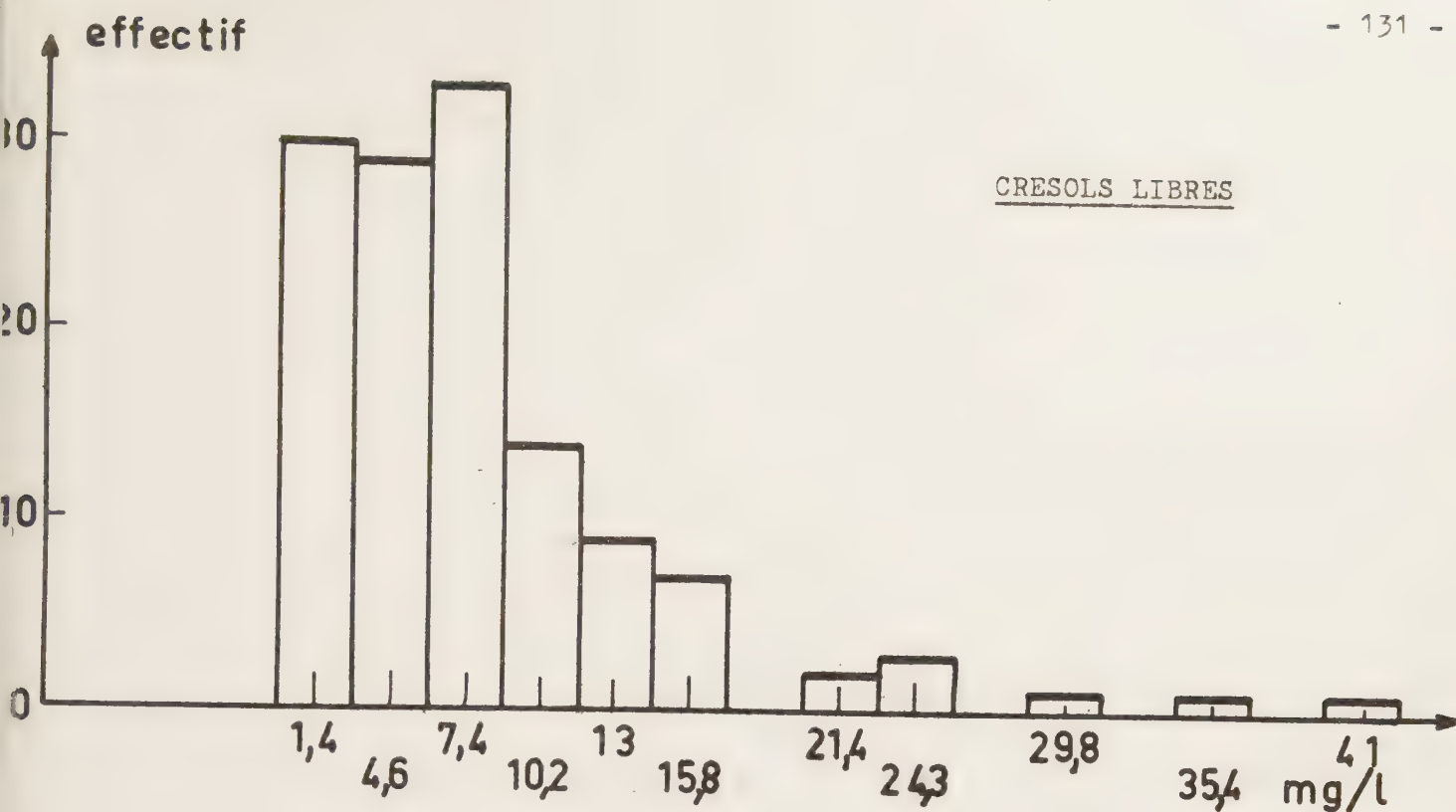


FIGURE N° 8 : REPARTITION DES CRESOLS CHEZ LESTEMOINS

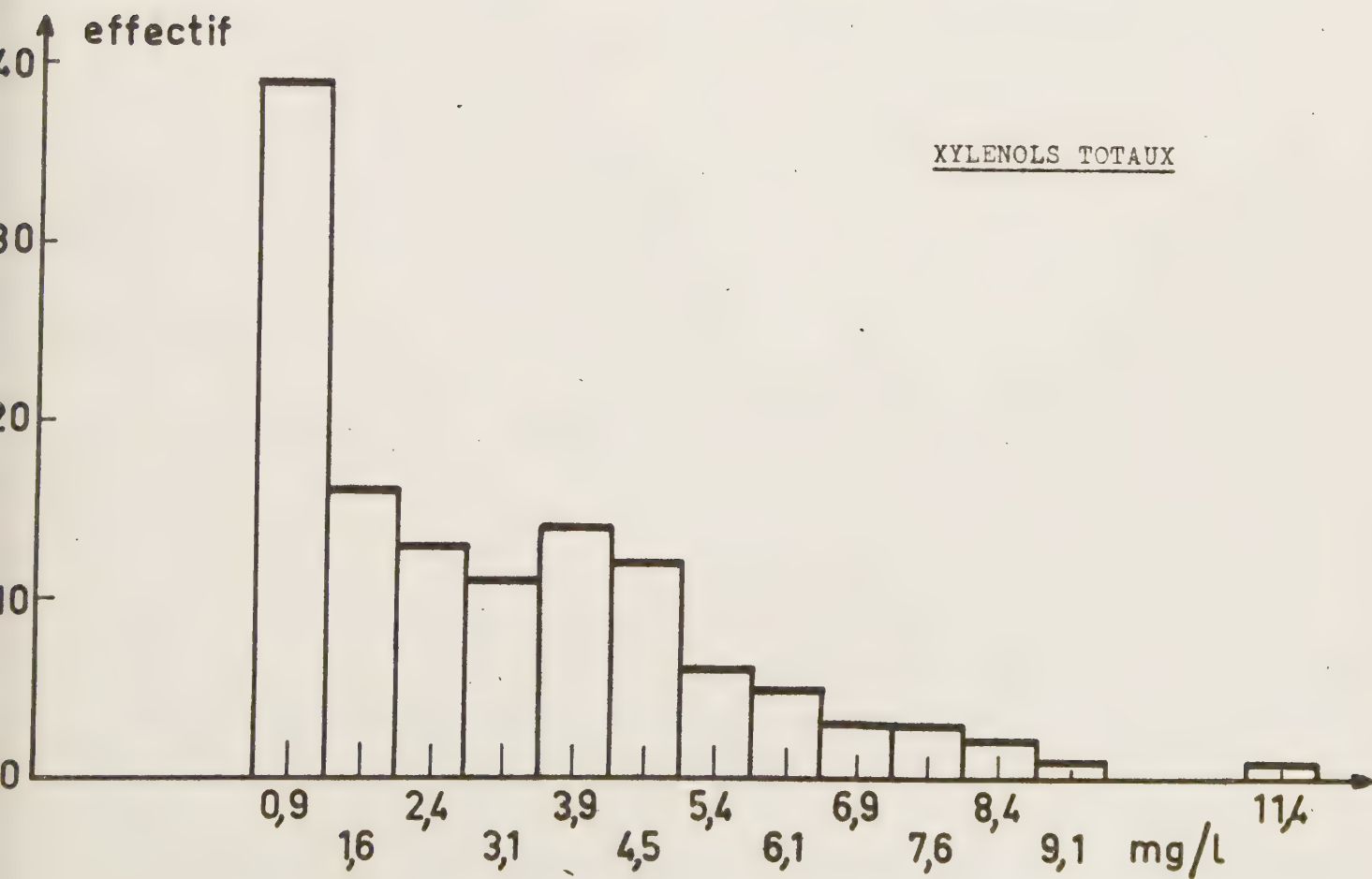
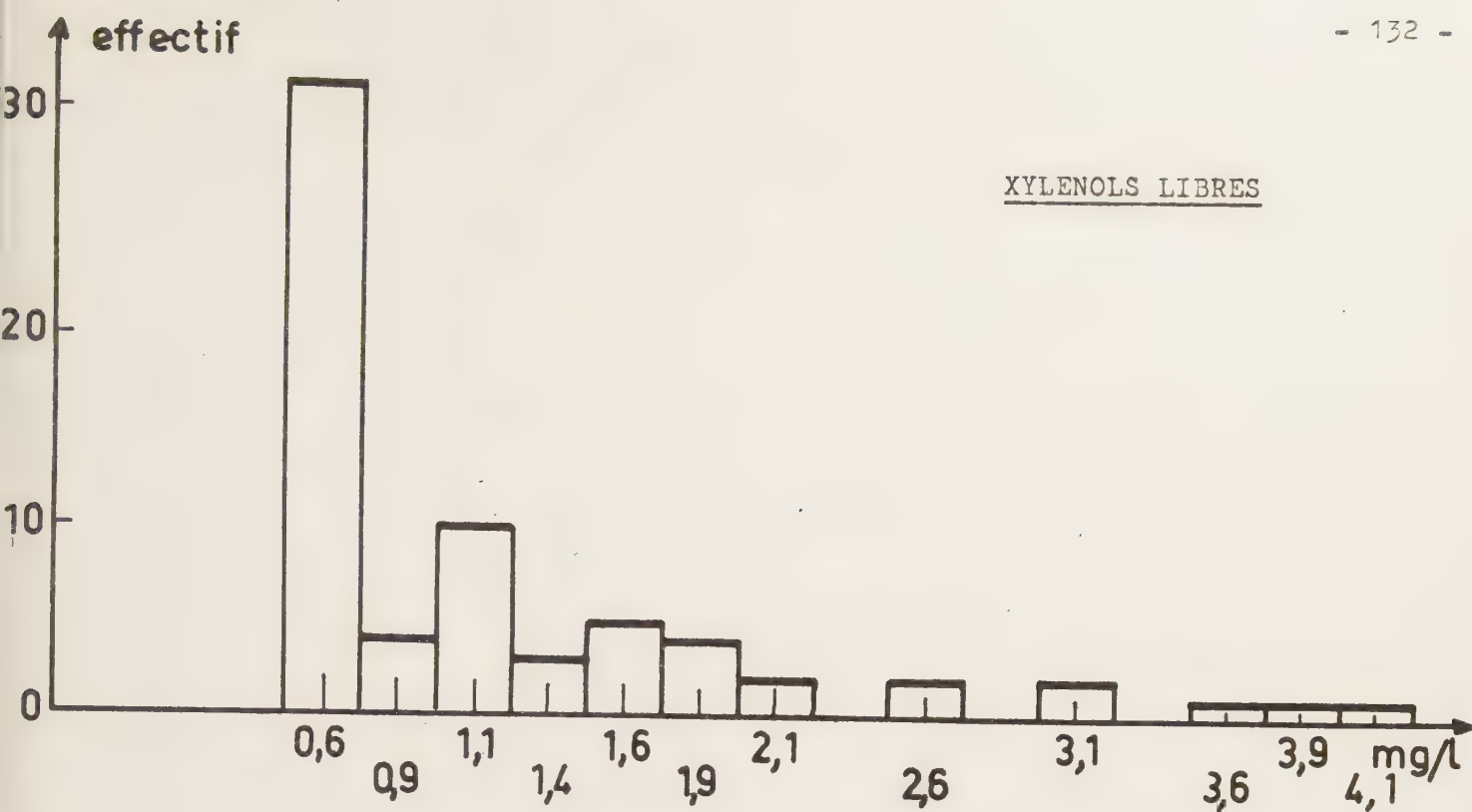


FIGURE N° 9 : REPARTITION DES XYLENOLS CHEZ LES TEMOINS

Une répartition en classes du phénol total (figure n° 10) montre une distribution composite avec 17 cas normaux et 47 cas supérieurs à la valeur maximum déterminée chez les témoins (8,20 mg/litre).

Une étude plus détaillée montre une moyenne de phénol total nettement plus élevée chez 14 sujets, sur des prélèvements effectués après exposition (tableau n° 19), l'augmentation au phénol libre étant normale car la conjugaison reste inchangée en pourcentage.

en mg/litre	PHENOL		CRESOLS		XYLENOLS	
	libre	total	libres	totaux	libres	totaux
effectifs	14	14	14	14	11	12
moyenne	5,15	29,67	13,25	51,86	1,06	4,21
écart type	4,04	17,17	10,06	29,82	0,58	4,40
erreur sur la moyenne	1,07	4,58	2,68	7,96	0,17	1,27

TABEAU N° 19 : RESULTATS APRES EXPOSITION AU BENZENE

D'autre part, trois sujets ont été étudiés après intoxication aigüe ayant nécessité une hospitalisation. Dans ce cas, les résultats trouvés ont été de 37, 47 et 53 mg/litre. Ces taux sont importants, car environ 10 fois supérieurs au taux moyen trouvé chez les témoins.

Une expérience a été réalisée sur l'élimination urinaire du phénol chez 7 personnes travaillant à la purification du

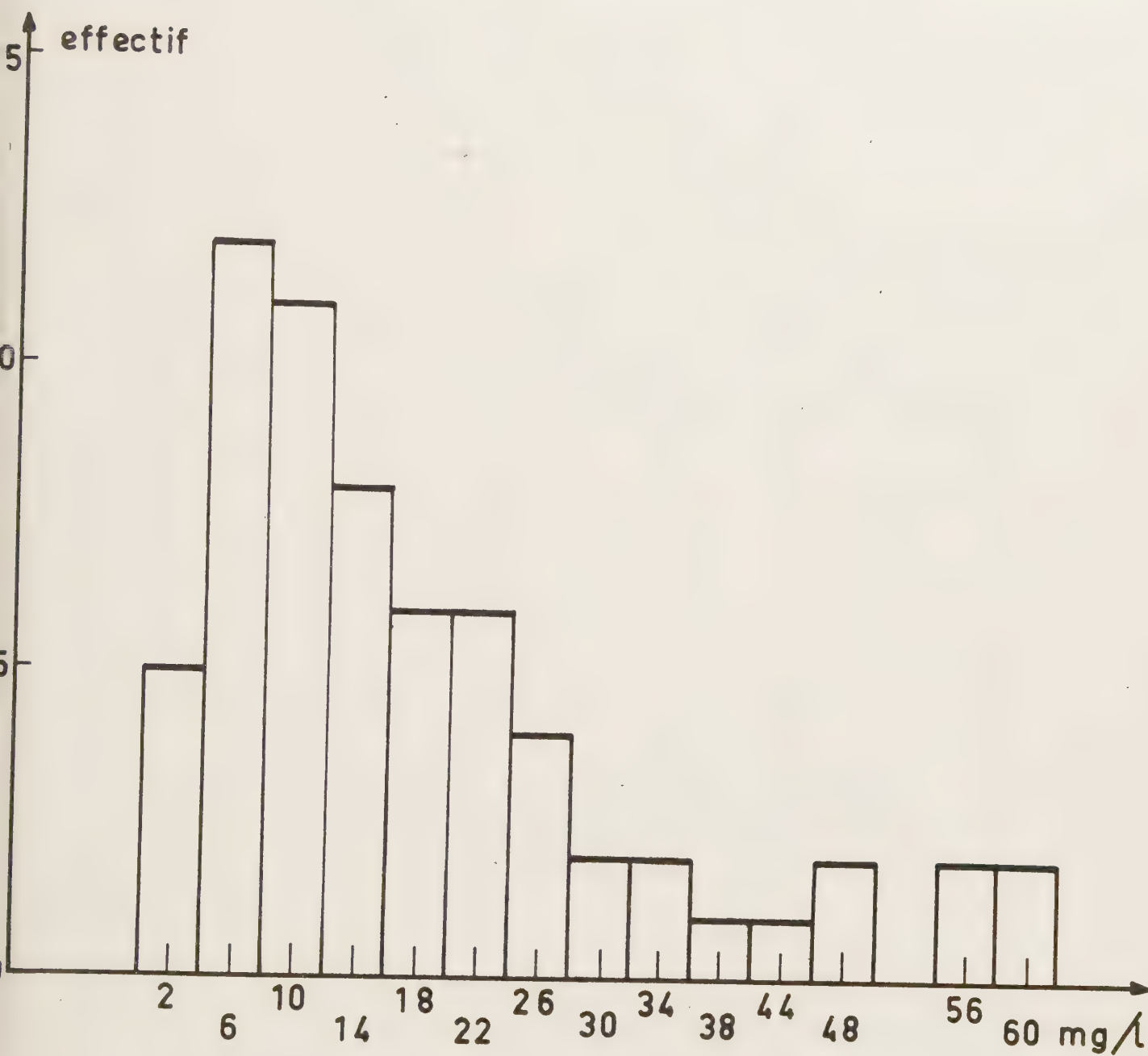


FIGURE N° 10 : REPARTITION DU PHENOL TOTAL

APRES EXPOSITION AU BENZENE

benzène par distillation. Pour cette étude, des prélèvements d'urine ont été effectués avant, à la fin et 6 heures après une manipulation ayant duré environ deux heures. Les résultats constituent le tableau n° 20 et la figure n° 11.

		PHENOL TOTAL en mg/litre		
moment du prélèvement		avant manipulation	en fin de manipulation	6 heures après manipulation
essai	1	26	35	17
	2	5,2	10	13,7
	3	6,6	10,1	14,5
	4	6,2	20,7	17,8
	5	3,2	11,4	17
	6	22,5	23	27,3
	7	6,8	22	

TABLEAU N° 20 : EVOLUTION DU PHENOL TOTAL

LORS DE L'EXPOSITION AU BENZENE

L'étude de la figure n° 11 montre une élévation de l'élimination phénolique en fin de travail, augmentation qui, le plus souvent, se poursuit 6 heures après. Les taux avant manipulation permettent de classer les sujets en deux groupes : un groupe de 5 personnes ayant un phénol normal, et un autre de 2 personnes au taux nettement supérieur. Pour ces derniers ce taux peut être expliqué par une exposition la veille de l'expérience, le benzène continuant à être éliminé sous forme de phénol le lendemain matin.

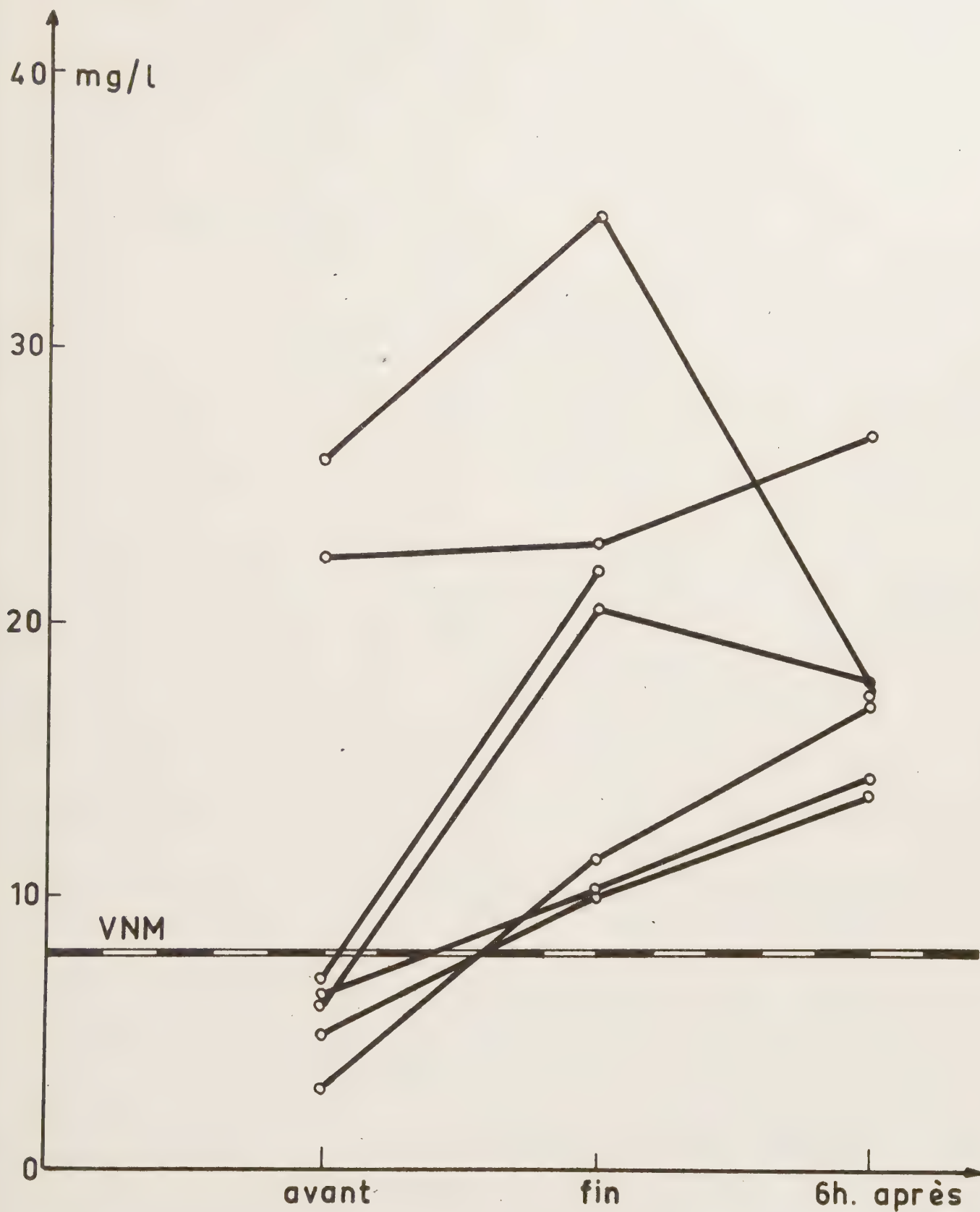


FIGURE N° 11 : EVOLUTION DU PHENOL TOTAL
LORS D'UNE EXPOSITION AU BENZENE

x VNM : valeur normale maximum.

VIII.1.2. Toluène :

Une série de 100 dosages ont été effectués chez les sujets exposés au toluène. L'étude statistique de l'ensemble des résultats est contenue dans le tableau n° 21, où apparaît une augmentation significative des crésols totaux, les autres paramètres restant semblables à ceux des témoins.

en mg/litre	PHENOL		CRESOLS		XYLENOLS	
	libre	total	libres	totaux	libres	totaux
effectifs	100	100	100	100	93	100
moyenne	1,45	5,17	14,42	83,97	1,88	3,55
écart type	1,06	4,62	12,02	55,21	2,62	4,17
erreur sur la moyenne	0,10	0,46	1,20	5,52	0,28	0,41

TABLERAU N° 21 : RESULTATS GLOBAUX CHEZ LES SUJETS EXPOSES AU TOLUENE

Une distribution en classes des crésols totaux (figure n° 12) montre 79 cas normaux et 21 cas augmentés se répartissant en deux populations.

Une étude, en tenant compte des conditions d'exposition, fait apparaître :

- lors d'une exposition régulière : des taux de crésols totaux de 218, 240 et 283 mg/litre (4 à 5 fois la moyenne des témoins) ;
- après manipulation intermittente : une moyenne des crésols totaux à 92 mg/litre (tableau n° 22).

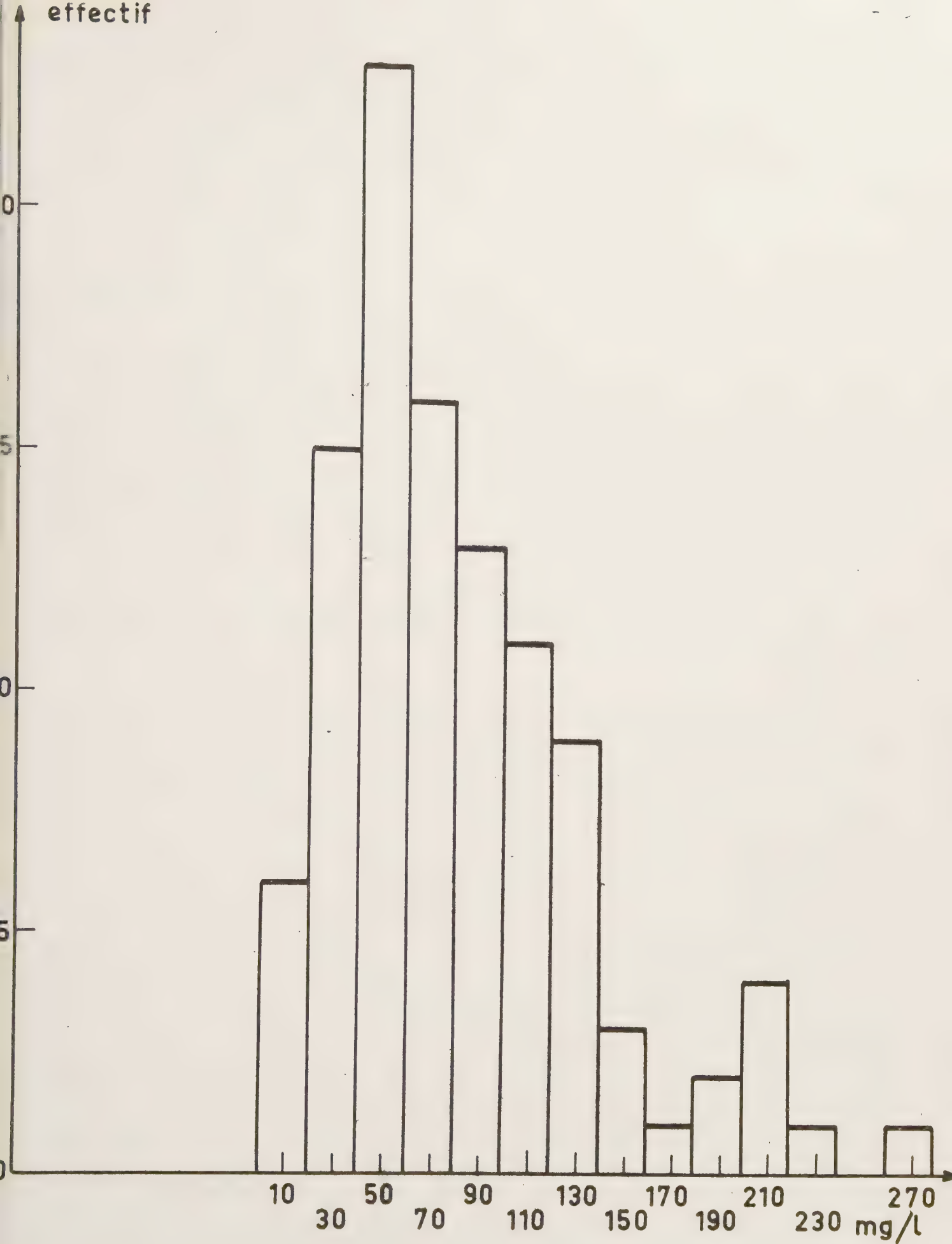


FIGURE N° 12 : REPARTITION DES CRESOLS TOTAUX

APRES EXPOSITION AU TOLUENE.

en mg/litre	PHENOL		CRESOLS		XYLENOLS		ACIDE ISOPH- ENIQUE
	libre	total	libres	totaux	libres	totaux	
effectifs	10	10	10	10	10	10	10
moyenne	1,09	4,73	19,46	92,10	1,87	3,01	1,01
écart type	0,64	3,86	13,33	46,59	2,41	1,56	0,42
erreur sur la moyenne	0,20	1,22	4,21	14,73	0,76	0,80	0,15

TABLERAU N° 22 : RESULTATS APRES EXPOSITION INTERMITTANTE AU TOLUENE

- D'autre part, une série de dosage a été réalisée sur des laborantines utilisant du toluène pur pour nettoyer des lames de microscope, sans aucune protection. Une comparaison des résultats montre que, pour la personne exposée depuis plusieurs années (tableau n° 23), les crésols totaux sont moins augmentés que chez celle manipulant depuis peu (tableau n° 24).

en mg/litre	PHENOL		CRESOLS		XYLENOLS	
	libre	total	libres	totaux	libres	totaux
effectifs	34	34	34	34	25	34
moyenne	1,11	4,01	12,64	71,28	1,83	2,84
écart type	0,71	2,30	14,03	39,89	2,59	4,23
erreur sur la moyenne	0,12	0,48	2,40	6,84	0,51	0,72

TABLERAU N° 23 : RESULTATS CHEZ UNE LABORANTINE

MANIPULANT DU TOLUENE DEPUIS PLUSIEURS ANNEES.

en mg/litre	PHENOL		GRESOLS		XYLENOLS	
	libre	total	libres	totaux	libres	totaux
effectifs	12	12	12	12	11	12
moyenne	0,77	1,81	19,46	130,92	0,73	2,17
écart type	0,20	1,31	14,28	41,75	0,25	1,26
erreur sur la moyenne	0,05	0,37	4,12	12,05	0,07	0,36

TABLEAU N° 24 : RESULTATS CHEZ UNE LABORANTINE

MANIPULANT DU TOLUENE DEPUIS PEU

L'évolution des crésols totaux a été suivie chez deux sujets en début d'exposition. Les résultats constituent le tableau n° 25 et la figure n° 13.

temps	LABORANTINE 1				LABORANTINE 2			
	matin		soir		matin		soir	
	crésols totaux (mg/l)	conjugaison (en %)	crésols totaux (mg/l)	conjugaison (en %)	crésols totaux (mg/l)	conjugaison (en %)	crésols totaux (mg/l)	conjugaison (en %)
pour 1	63	98	143	98	139	92	160	93
2	122	97	134	96	128	84	220	81
3	118	88	220	88	120	74		
4	97	69	143	72				
5	78	62	127	68				

TABLEAU N° 25 : EVOLUTION DES CRESOLS TOTAUX ET DE LA CONJUGAISON

CHEZ 2 LABORANTINES COMMENCANT A MANIPULER DU TOLUENE.

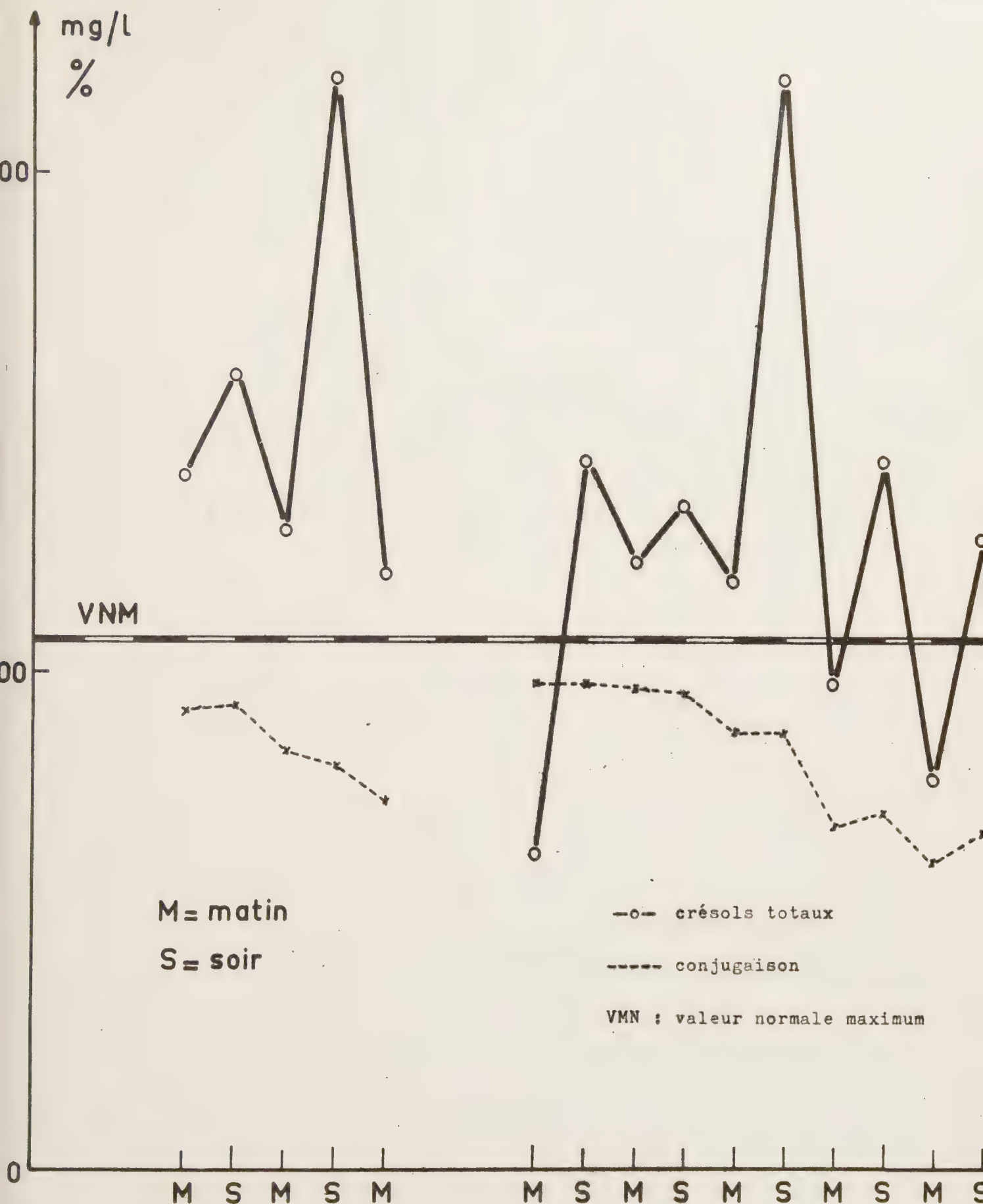


FIGURE N° 13 : EVOLUTION DES CRESOLS ET DE LA CONJUGAISON

CHEZ DEUX LABORANTINES COMMENCANT A MANIPULER DU TOLUENE.

L'étude de ces résultats montre :

- des taux toujours plus élevés le soir, donc après l'exposition ;
- une conjugaison normale (supérieure à 90 %) au début, qui diminue au cours du temps, respectivement jusqu'à 74 % et 62 %. Il semble donc se produire une légère atteinte hépatique dont la diminution de la conjugaison est le reflet. Cette atteinte semble être passagère car elle n'est pas retrouvée chez les personnes exposées depuis longtemps.

VIII.2.3. Xylènes :

62 déterminations ont été réalisées après exposition au xylène commercial (50 % de méta-xylène). Les solvants manipulés ont été analysés. L'analyse a révélé deux sortes de produits :

- xylène contenant des traces de benzène et de toluène, servant de solvant à des xylénols ;
- xylène contenant du phénol.

Les dosages des phénols urinaires correspondant constituent respectivement les tableaux n°s 26 et 27, sur lesquels apparaissent :

- une nette augmentation, dans les deux cas, des xylénols totaux ;
- une augmentation du phénol chez les sujets exposés au phénol.

en mg/litre	PHENOL		CRESOLS		XYLENOLS	
	libre	total	libres	totaux	libres	totaux
effectifs	51	51	51	51	51	51
moyenne	2,04	7,44	18,78	60,57	9,01	28,39
écart type	1,43	3,38	14,24	33,07	6,33	18,71
erreur sur la moyenne	0,20	0,47	1,99	4,63	0,88	2,61

TABLEAU N° 26 : PHENOLS APRES EXPOSITION

AU XYLENE COMMERCIAL CONTENANT DES XYLENOLS.

en mg/litre	PHENOL		CRESOLS		XYLENOLS	
	libre	total	libres	totaux	libres	totaux
effectifs	11	11	11	11	11	11
moyenne	5,82	33,83	9,86	70,73	4,76	48,73
écart type	4,20	12,80	9,49	23,51	5,35	19,50
erreur sur la moyenne	1,26	3,85	2,86	7,08	1,61	5,37

TABLEAU N° 27 : PHENOLS APRES EXPOSITION AU XYLENE COMMERCIAL + PHENOL.

La distribution en classes des xylènes totaux (figure n° 14) montre 6 résultats normaux et 56 augmentés, la répartition n'ayant pas de forme définie.

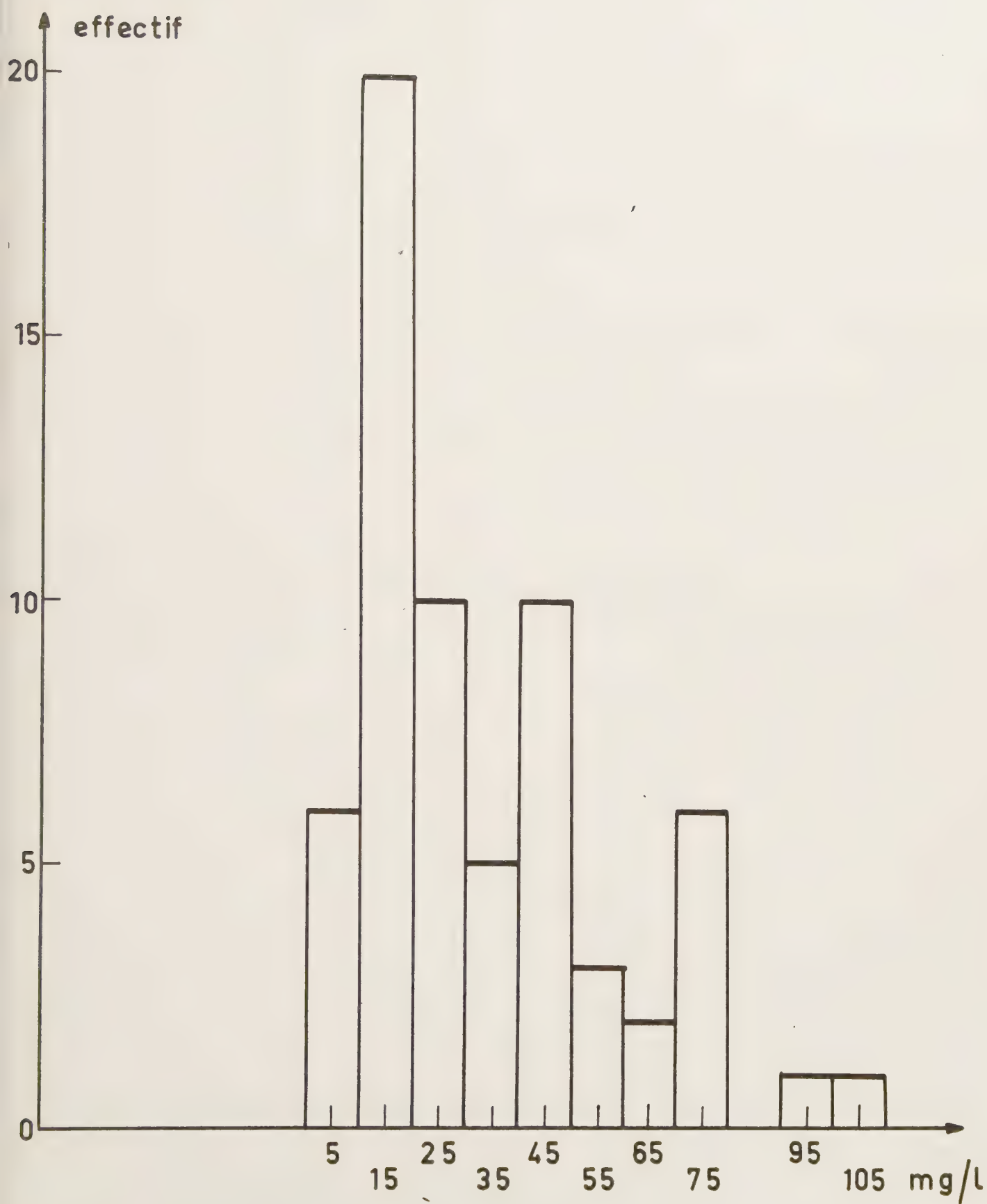


FIGURE N° 14 : REPARTITION DES XYLENOLS TOTAUX

APRES EXPOSITION AUX XYLENES.

Trois ouvriers manipulant du xylène et une personne se tenant dans l'environnement ont pu être suivis pendant un mois. Les prélèvements étaient effectués deux fois par semaine, en fin de journée. Les résultats (tableau n° 28 et figure n° 15) montrent :

- chez les ouvriers en contact direct avec le solvant, des taux toujours très élevés, variant en dents de scie au cours du temps ;
- pour la personne simplement dans l'environnement, les taux élevés, mais bien inférieurs à ceux des précédents.

exposés	XYLENOLS TOTAUX (mg / litre)			
	manipulateurs			personne de l'environnement
dates :				
5 Juin	16	60	7	19
9 -	29,5	29	26	14
12 -	50	26	20	9,5
15 -	75	22	19	16
19 -	64	51	20	19
23 -	41	36	11,5	16
24 -	41	21	11,5	4
26 -	64	71	45	20
29 -	71	50	80	
2 Juillet	60	47	27	
5 -	33	91	33	

TABEAU N° 28 : EVOLUTION DES XYLENOLS TOTAUX
CHEZ 4 PERSONNES EXPOSEES AU XYLENE COMMERCIAL.

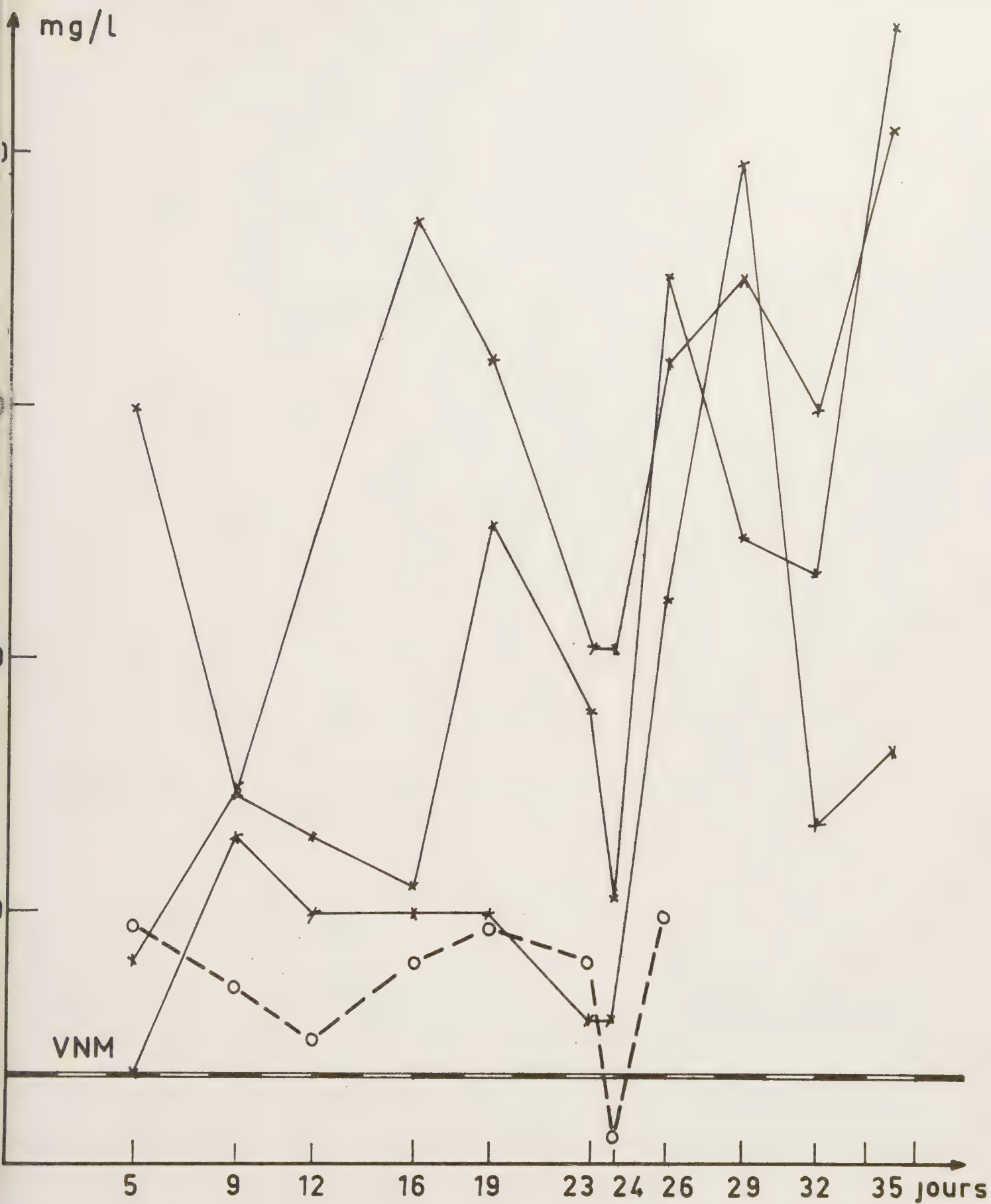


FIGURE N° 15 : EVOLUTION DES XYLENOLS TOTAUX

CHEZ 3 MANIPULATEURS DE XYLENES (—) ET 1 PERSONNE DE L'ENVIRONNEMENT (---)

VIII.1.4. Chlorobenzène :

30 dosages des phénols urinaires ont été pratiqués chez les sujets exposés au chlorobenzène. L'étude statistique des résultats (tableau n° 29) ne fait apparaître aucune variation significative par rapport aux témoins.

en mg/litre	PHENOL		CRESOLS		XYLENOLS	
	libre	total	libres	totaux	libres	totaux
effectifs	60	60	60	60	19	58
moyenne	1,31	4,41	10,25	47,02	1,61	2,45
écart type	1,07	4,40	6,58	32,89	1,12	2,84
erreur sur la moyenne	0,13	0,55	0,84	4,24	0,25	0,57

TABLEAU N° 29 : RESULTATS OBTENUS APRES EXPOSITION AU CHLOROBENZENE

VIII.3. EXPOSITION INCONNUE :

Une série de 100 prélèvements a été effectuée lors des consultations des maladies professionnelles, en vue de dépister une exposition aux hydrocarbures benzéniques. Quatre déterminations ont été pratiquées sur ces prélèvements : phénol, crésols, xylénols et acide hippurique* urinaires. Les résultats obtenus ont été classés en résultats normaux et augmentés, en tenant compte des intervalles de prédiction établis

déterminé selon la technique de BARDODEJ (22).

chez les témoins, puis selon qu'un ou deux paramètres étaient élevés (tableau n° 30).

Une étude ultérieure des dossiers a permis de compléter le tableau selon le type d'exposition déterminé par interrogatoire du consultant ou enquête sur les lieux de travail.

L'analyse du tableau n° 30 permet de définir une valeur de dépistage global de 67,2 %, soit environ deux chances sur trois de déduire l'exposition à un hydrocarbure benzénique par le dosage des mono-phenols urinaires.

RESULTATS : TAUX type d'exposition	NORMAUX		PHENOLS TOTAUX AUGMENTES (en mg/litre)				ACIDE ANTHRAQUIQUE AUGMENTE (g/l)				TOTAL
	taux et composés	taux et composés	PHENOL 8 à 15	PHENOL >15	CRESOLS >108	XYLENOLS >7,5	PHENOL et CRESOLS	XYLENOLS	et PHENOL	et CRESOLS	et XYLENOLS
nul		6	1								9
inconnu		19	12	2	3	3	1	2	2		44
benzène		2	5	5							13
toluène		2	2	2	1				1	3	16
xylènes		2			1						5
autres expositions	10			1							13
nombre de cas observés	41	20	10	3	5	3	1	3	3	3	100
nombre d'expositions connues	22	8	8	2	2			1	1	3	56
dépistage positif	16	5	5	1	1			0	1	3	38
dépistage négatif	6	3	3	1	1			1	0	0	18
valeur du dépistage en %	72,7	62,5	62,5	50	50			0	100	100	67,8

TABLEAU N° 30 : UTILISATION DE LA METHODE

EN VUE DU DEPISTAGE D'UNE EXPOSITION AUX HYDROCARBURES BENZÉNIQUES

C O N C L U S I O N
=====

Nous avons tout d'abord rappelé le métabolisme des hydrocarbures benzéniques et les principales méthodes de dosage des métabolites.

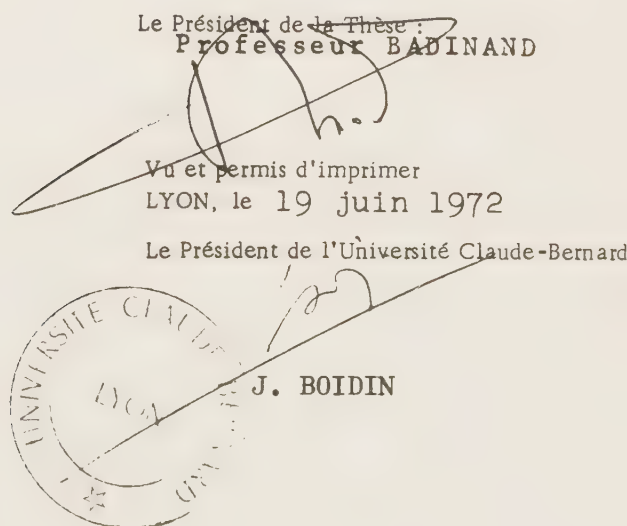
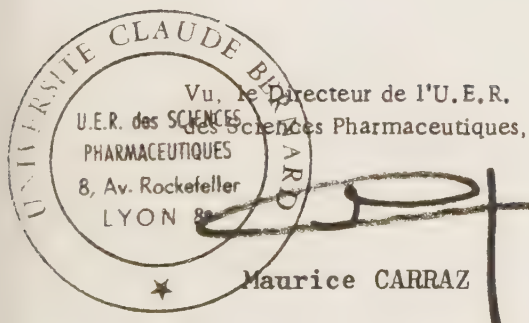
L'application de la chromatographie en phase gazeuse au dosage du phénol, des crésols et des xylénols urinaires, a nécessité une mise au point. La modification de la chambre d'injection, la recherche de phases stationnaires et d'étalons internes, l'étude des conditions d'hydrolyse des dérivés conjugués, sont les points essentiels que nous avons étudiés, et leur résolution a permis d'améliorer la technique de dosage.

Cette méthode présente les avantages suivants :

- spécificité : le dosage séparément du phénol, des crésols et des xylénols, permet de définir le risque d'exposition, dans la mesure où les métabolites urinaires sont spécifiques de tel ou tel hydrocarbure : phénol pour le benzène, crésols pour le toluène et xylénols pour les xylènes.
- précision et fidélité : l'étude statistique montre que ces caractères sont suffisants pour l'utilisation de la méthode en biologie.
- rapidité : elle permet l'emploi systématique de la méthode et l'analyse en série.

Plus de 500 dosages urinaires ont été faits, tant chez des témoins pour établir un taux normal pour chaque phénol, que chez des sujets exposés à un risque benzénique pour vérifier l'exposition et étudier l'élimination des métabolites. Le nombre important des résultats obtenus en a permis l'étude statistique où il apparaît que le taux des phénols urinaires chez les sujets témoins est très dispersé, ce qui oblige à certaines précautions quant à leur utilisation sur le plan clinique.

- Les résultats seront significatifs dans 100 % des cas si un prélèvement peut être effectué avant et après exposition, ce qui, en pratique, est rarement possible.
- Dans le cas le plus général, c'est à dire pour un prélèvement unique et non défini dans le temps par rapport au moment de l'exposition, les résultats restent significatifs dans 68 % des cas. L'interprétation devra donc tenir compte du moment du prélèvement, du type de produits manipulés, des données cliniques et des autres déterminations qui pourront être faites. En particulier, il reste souhaitable d'associer à l'analyse des phénols urinaires celle de l'atmosphère correspondant au risque d'exposition et celle des solvants manipulés pour lesquels la chromatographie en phase gazeuse reste la méthode de choix.



- B I B L I O G R A P H I E -

- 112 -
1. ABDERHALDEN E., STAUSS H. :
Beitrag zur kenntnis des umfanges der hippursäurebildung in
organismus des schweines.
Z. Physiol. Chem. (1914), 91, 81.
 2. ABIGNENTE E. :
Aspetti recenti della toxicologia chimica dei fenoli.
Boll. Chim. Farm. (1968), 107, 332.
 3. ABOU EL MAKAREM M.M., MILLBURN P., SMITH R.L., WILLIAMS R.T. :
Biliary excretion of foreign compounds benzene and its deri-
vatives in rat.
Biochem. J. (1967), 105, 1269.
 4. ABRAMOVA Z.I., GADASKINA R. :
Inhibition of oxidation of benzene by certain antioxidants.
Fed. Proc. (Transl. suppl.) (1966), 25, 91.
 5. ARGAUER R.J. :
Rapid procedure of the chloro acetylation of microgram quan-
tities of phenols and detection by electron -capture gas
chromatography.
Anal. Chem. (1968), 40, 122.
 6. ARMSTRONG M.D., CHAO F.C., PARKER V.T., WALL P.E. :
Endogenous formation of hippuric acid.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. (1955), 90, 675.
 7. ARNSTEIN R.V., NEUBERGER A. :
Hippuric acid synthesis in the rat.
Biochem. J. (1951), 50, 154.
 8. AYENGER P.K., MAYAISHI O. :
Enzymic aromatization of 3-5 cyclohexodiene 1-2 diol.
Biochim. Biophys. Acta (1959), 33, 111.

9. AZOUZ W.M., PARKE D.V., WILLIAMS R.T. :
Studies in detoxication.
The determination of catechols in urine and the formation of catechol in rabbits receiving halogenobenzenes and other compounds. Dihydroxylation in vivo.
Biochem. J. (1953), 55, 146.
10. BAERNSTEIN M.D. :
The determination of catechol, phenol and hydroquinone in urine.
J. Biol. Chem. (1945), 161, 685.
11. BAKKE O.M. :
Degradation of tyrosine by rat cecal contents.
Scand. J. Gastroenterol. (1969), 4, 603.
12. BAKKE O.M. :
Urinary simple phenols in rats fed purified and unppurified diets.
J. Nutr. (1969), 98, 209.
13. BAKKE O.M. :
The effect of neomycin and experimental coprostasis on the excretion of simple phenols in the rat.
Scand. J. Gastroenterol. (1969), 4, 419.
14. BAKKE O.M., SCHELINE R.R. :
Analysis of simple phenols of interest in metabolism.
I. Gas chromatographic separation and quantitative determination.
Anal. Biochem. (1969), 27, 439.
15. BAKKE OM., SCHELINE R.R. :
Analysis of simple phenols of interest in metabolism.
II. Conjugate hydrolysis and extraction methods.
Anal. Biochem. (1969), 27, 451.

16. BAKKE O.M., SCHELINE R.R. :
Hydroxylation of aromatic hydrocarbons in the rat.
Toxic. Appl. Pharmacol. (1970), 16, 691.
17. BAKKE O.M., SCHELINE R.R. :
Influence of germ free status on the excretion of simple phenols of possible significance in tumour promotion.
Experientia (1970), 26, 519.
18. BANDURSKI R.S., WILSON L.G., SQUIRES C.L. :
The mechanism of "active sulfate" formation.
J. Am. Chem. Soc. (1956), 78, 6408.
19. BARAC G. :
Dosage spectrographique du phénol dans les différents milieux.
Compte-rend. de la Soc. Biol. (1935), 120, 520
20. BARBER E.D., SAWICKI E., Mc PHERSON S.P. :
Separation and identification of phenols in automobile exhaust by paper and gas liquid chromatography.
Anal. Chem. (1964), 36, 2442.
21. BARDODEJ Z., BARDODEJOVA E., BENES V. :
Diuresis and phenol test.
Cs. Hyg. (1962), 7, 49.
22. BARDODEJ Z. :
Mesure de l'exposition au toluène par dosage de l'acide hippurique dans les urines.
Arbeitsmedizin Sozialmedizin Arbeitshygien (1968), 254.
Note n° 645-55-89 de l'Institut National de Recherche et de Sécurité.
23. BARNES L.A., MELLMAN W.S., TEDESCO T., YOUNG D.G., NOCHO R. :
A quantitative method of determining urinary phenols.
Clin. Chem. (1963), 9, 600.

24. BAUMANN E. :
Über gepaarte schwefelsauren in organismus.
Pflügeres archives. (1876), 13, 285.
25. BAUMANN E., HERTER E. :
Über die synthese von aetherschweifelsauren und das verhalten
einiger aromatischer substanzen im thierkörper.
Z. Physiol. Chem. (1877), 1, 244.
26. BAUMANN E. :
Über die bestimmung der schwefelsäure un horn.
Z. Physiol. Chem. (1877), 1, 70.
27. BAUMANN E., PREUSSE C. :
Zur kenntniso der oxydationen und synthesen im thierkörper.
Z. Physiol. Chem. (1879), 3, 156.
28. BAUMANN E. :
Useitere beitröge zur keuntnis der aromatischen substanzen
des thierkörpers.
Z. Physiol. Chem. (1880), 4, 304.
29. BAUMANN E. :
Die aromatischen verbindungen in horn und darmfönlmiss.
Z. Physiol. Chem. (1886), 10, 123.
30. BECKERING W., FOWKES W.W. :
Analysis of polyhydric phenol mixtures.
Anal. Chem. (1958), 30, 1336.
31. BEHRMAN E.S., GOSWAMI M.N.D. :
Quantitative determination of ortho and para dihydric phenols
in presence of monohydric phenols by use of a phosphotungstic
acid reagent.
Anal. Chem. (1964), 36, 2189.

32. BERGEROVA V., SKRAMOUSKY S. :
Determination of pyrocatechin and hydroquinone in urine.
Procov. Lekar. (1952), 4, 64.

33. BERGLUND F., SORBO B. :
Turbidimetric analysis of inorganic sulfate in serum, plasma and urine.
Scand. J. Clin. Invest. (1960), 12, 147.

34. BERNHARD K., GRESSLY E. :
Stoffwechselversuche zur dehydrierung des cyclohexanringes.
Z. Physiol. Chem. (1937), 248, 256.

35. BERNHARD K., GRESSLY E. :
Zur oxydation des benzolrings im thierkörper.
Helv. Chim. Acta (1941), 24, 83.

36. BHATTA CHARRYA A.C., GUHA O.K., BASU R.N. :
Gas chromatography of monohydric phenols via O. méthylation.
Anal. Chem. (1968), 40, 1873.

37. BLENDERMAN H. :
Beiträge zur kenntnis der bildung und zersetzung des tyrosius im organismus.
Z. Physiol. Chem. (1882), 6, 234.

38. BOOTH J., BOYLAND E. :
Enzymic hydroxylation by rat liver microsomes.
Biochem. J. (1957), 66, 73.

39. BORDAS M.F., ROBIN L. :
Du dosage du phénol dans les urines.
Séances et Mémoires de la Soc. de Biol. (1898), 5, 87.

40. BORSOOK H. :
Synthesis of hippuric acid in liver homogenate.
J. Biol. Chem. (1947), 168, 397.

41. BOYDEN J.W., BROWN D.A. :
Gas liquid chromatographic determination of phenols on octatis
(2-4 xylyl) pentaerythritol tetraphosphate.
Z. Anal. Chem. (1971), 254, 32.

42. BRAUSTEIN A.F., PARSHIN A.W., CHALISOWA O.P. :
Über den einfluss der sogen sauren und basischen nahrung auf
das schickool aromatischer substanzen im organismus.
I. Mitteilung : oxydation und padrung von phenol und benzol.
Biochem. Z; (1931), 235, 311.

43. BRAY H.G., BRENDAG, HUMPHRIS G., THORPE W.V. :
Metabolism of derivatives of toluene o, m, p-xylenes.
Biochem. J. (1949), 45, 241.

44. BRAY H.G., THORPE W.V., WHITE K. :
Metabolism of derivatives of toluene 4-cresols.
Biochem. J. (1950), 46, 275.

45. BRAY H.G., HUMPHRIS B.G., THROPE W.V. :
Metabolism of derivatives of toluene. The fate of the xylenols
in the rabbit with further observations on the metabolism of
the xylenes.
Biochem. J. (1950), 47, 395.

46. BRAY H.G., THORPE W.V., WHITE K. :
Kinetic studies of the metabolism of foreign organic compounds.
The formation of benzoic acid from benzamide, toluene, benzyl
glycol and benzaldehyde, and its conjugaison with glycine and
glucuronic acid in rabbits.
Biochem. J. (1951), 48, 88.

47. BRAY H.G. :
D-glucuronic acid in metabolism.
Advanc. Corbolyd. Chem. (1953), 8, 251.
48. BREWER R.H., WEISKOTTE N. :
III. The urinary phenols.
J. Med. Research. (1916), 35, 71.
49. BRIDGES J.W., FRENCH M.R., SMITH R.L., WILLIAMS R.T. :
The fate of benzoic acid in various species.
Biochem. J. (1970), 118, 47.
50. BRIEGER L. :
Uber phenolanscheidung bei krankheiten und nach tyrosin ge-
branch.
Z. Physiol. Chem. (1878), 2, 241.
51. BROWNING E. :
Toxicity and metabolism of industrial solvents.
ELSEVIER (1965).
52. BUCHWALD H. :
The colorimetric determination of phenol in air and urine
with a stabilized diazonium salt.
Ann. Occup. Hyg. GB (1966), 9, 1, 7.
53. BUNGE G., SCHMEIDEBERG O. :
Arbeiten aus dem laboratorium für experimentelle pharmatro-
logie zu Strasbourg.
Arch. Exper. Path. U. Pharmakel. (1877), 6, 233.
54. BURBA J.V. :
Shortcomings of the quinone chloroimide colorimetric method
for the determination of phenols.
Anal. Biochem. (1968), 24, 344.

55. BURGESS A.E., LATHAM J.L. :
The determination of phenol, O-cresol and p-cresol in solution
aqueuse by kinetic method.
The Analyst. (1966), 91; 343.
56. CALLOW E.H., HELE T.S. :
The effect of benzene and some derivatives of benzene on sulfur
metabolism.
Biochem. J. (1926), 20, 598.
57. CHAKRA BORTY J., SMITH J.N. :
Enzymic oxidation of some alkylbenzenes in insects and verte-
brates.
Biochem. J. (1967), 102, 498.
58. CHANTRENNE H. :
The requirement for coenzyme A in the enzymatic synthesis of
hippuric acid.
J. Biol. Chem. (1951), 189, 227.
59. CHILDS A.W., LIEBERMAN A.H. ;
Effect of ethanol on formation of hippuric acid by the liver.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1964), 116, 881.
60. CHRISTIANI A. :
Veber das verhalten von phenol indol und benzol im thierkörper.
Z. Physiol. Chem. (1878), 2, 273.
61. CLARK I.T. :
Chromatographic separation of phenols on ion exchange paper.
J. Chromatogr. (1964), 15, 65.
62. COHEN I.C., NORCUP J.H., RUZICKA H.A., WHEALS B.B. :
Trace determination of phenol by gas chromatography as their
2-4 dinitro phenyl ethers.
J. Chromatogr. (1969), 44, 251.

63. CONNEY A.H., BURNS J.J. :
Factors influencing drug metabolism.
Advanc. Pharmacol. (1962), 1, 31.
64. CONNING D.M., HAYES M.J. :
The dermal toxicity of phenol : on investigation of the most
effective first-aid measures.
Brit. J. Indust. Med. (1970), 27, 155.
65. FORNISH A.H., RYAN R.C. :
Metabolism of benzene in nonfasted, fasted and aryl-hydroxylase
inhibited rats.
Toxicol Appl. Pharmacol. (1965), 7, 767.
66. CREPY O., JUDAS O., JAYLE M.F. :
Isolement et identification du sulfate de para crésol dans
l'urine humaine.
C. R. Acad. Sci.(PARIS) (1961), 253, 969.
67. CRUMP G.B. :
The paper chromatographic separation and identification of simple
phenols.
J. Chromat. (1963), 10, 21.
68. CRUMP G.B. :
Thin layer chromatographic analysis of simple alkyl phenols.
Anal. Chem. (1964), 36, 2447.
69. CURCI A. :
Azione e trasformazioni dei xileni nell'organismo.
Anna. Chim. Farmacol. (1892), 16, 3.
70. DAKIN H.D. :
The fate of sodium benzoate in the human organism.
J. Biol. Chem. (1910), 7, 103.

71. LAHM K., BREUER H. :
Partial purification of a soluble UDP glucuronyl transferase
from human intestine.
Biochem. Biophys. Acta (1966), 113, 404.
72. DAVIES D.S. :
Cytochrome P 450 and drug oxidation.
Biochem. J. (1969), 115, 23.
73. DAVIS R.S., HOSSLER F.E., STONE R.W. :
Metabolism of para and meta xylene by species of pseudomonas.
Can. J. microbiol. (1968), 14, 1005.
74. DEICHMAN N., SCHAFER L.J. :
Phenol studies.
Am. J. Clin. Path. (1942), 12, 129.
75. DELPRAT G.D., WHIPPLE G.H. :
Studies of liver function.
Benzoate administration and hippuric acid synthesis.
J. Biol. Chem. (1921), 49, 229.
76. DE MEIO R.H., TKACZ L. :
Conjugation of phenol by rat liver slices and homogenates.
J. Biol. Chem. (1952), 195, 175.
77. DE MEIO R.H., WIZERKANIUK M., SCHREIBMAN I. :
Enzymatic system synthesizing sulfur acid esters of phenols.
J. Biol. Chem. (1955), 213, 439.
78. DENIGES G. :
Sur un dosage de l'acide hippurique par colorimétrie.
Bull. Trav. Soc. Pharma. BORDEAUX (1940), 78, 57.

79. DESOILLE H., GAUDENZI-BRITTO T.F., PHILBERT M. :
Une nouvelle méthode de fractionnement des phénols urinaires.
Arch. Mal. Prof. (1969), 50, 129.
80. DICKENS F. :
The micro-estimation of benzoic and hippuric acids in biological material.
Biochem. J. (1951), 48, 216.
81. DIETRICH P. :
Monographie de chimie organique.
II. Chromatographie en chimie organique et biologique,
publié sous la direction de E. LEREDER (1959)
III. Phenols.
82. DOCTER H.J., ZIELMUIS R.L. :
Phenol excretion as a measure of benzene exposure.
Annal. Occup. Hyg. (1967), 10, 371.
83. DRUMMOND J.C., FINAR I.L. :
Muconic acid as a metabolic product of benzene.
Biochem. J. (1938), 32, 79.
84. DURMISHIDZE S.V., UGREKHELIDZE D.S., DZYIKNA A.N. :
Intermediate products of enzymatic oxidation of benzene and phenol.
DOKZ AKAD NAUK. (1969), 184, 466.
85. DUTKIEWICZ T. :
Evaluation of benzene exposure with the use of the phenol under industrial conditions.
T. Med. Pra. (1965), 16, 25.
86. DUTKIEWICZ T., TYRAS H. :
Skin absorption of toluene, xylene and styrene by man.
Brit. J. Indust. Med. (1968), 25, 243.

87. DUTTON G.C. :
Variation in glucuronide formation by mouse and rat perinatal liver.
Biochem. Pharmacol. (1966), 15, 947.
88. ELKINS H.B. :
The chemistry of industrial toxicology.
John WELEY and sons, NEW YORK (1950).
89. ELKINS H.B. :
Analyses of biological materials as indices of exposure to organic solvents.
Arch. Ing. Hyg. Occup. Med. (1954), 9, 212.
90. ELLIOT H.C. :
Microdetermination of hippuric acid in urine.
Anal. Chem. (1957), 29, 1712.
91. ELLISON T., OKUN R., SILVERSMAN A., SIEGEL M.,
Metabolic fate of amphetamine in the cat during development of tolerance.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. (1971), 190, 135.
92. ELLMAN G.L. :
A fluorometric method for the determination of hippuric acid.
J. Lab. Clin. Med. (1961), 57, 813.
93. EL MASRY A.M., SMITH J.N., WILLIAMS R.T. :
The metabolism of alkyl benzenes.
Biochem. J. (1956), 64, 50.
94. EMERSON E. :
The condensation of amino antipyrine.
II. New color test for phenolic compounds.
J. Org. Chem. (1943), 8, 417.

95. EPSTEIN I.S., BRAUNSTEIN A.F. :
Über den einfluss sogen saure und basischen nahrung auf das
schicksal aromatischer substanzen im organismus.
II. Mitteilung: oxydation von toluol.
Biochem. Z; (1931), 235, 328.
96. ESTABROOK F. :
Oxygene interaction with reduced cytochrome P-450.
Z. Physiol. Chem. (1968), 349, 1605.
97. ETTINGER M.R., RUCHOFT C.C., LISHKA H.J. :
Sensitive 4 amino antipyrine method for phenolic compounds.
Anal. Chem. (1951), 23, 1783.
98. EVANS W.C. :
Oxidation of phenol and benzoic acid by some soil bacteria.
Biochem. J. (1947), 41; 373.
99. EVANS R.A., PARR W.H., EVANS W.C. :
Paper partition chromatography of phenolic substances.
Nature. (1949), 164, 674.
100. EVANS W.C., SMITH B.S.W., LINSTEAD R.P., ELWIDGE A. :
Chemistry of the oxidative metabolism of certain aromatic com-
pounds by micro organisms.
Nature. (1951), 168, 772.
101. FABRE R. :
Sur le métabolisme des hydrocarbures cycliques : généralités.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1946), 28, 762.
102. FABRE R. :
Dosage du benzène et du toluène.
Etude comparative de la localisation du benzène et du toluène
dans l'organisme.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1946), 28, 764.

103. FABRE R. :
Le dosage des phénols libres et conjugués au cours de l'intoxi-
cation benzénique.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1946), 28, 757.
104. FABRE R. :
Métabolisme des hydrocarbures cycliques :
Etude des conditions d'oxydation et de conjugaison dans l'organisme.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1947), 29, 318.
105. FABRE R. :
Les modifications du rapport S conjugué / S total, au cours des
intoxications chroniques par le benzène et le toluène.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1947), 29, 322.
106. FABRE R. :
Métabolisme du benzène et du toluène.
Hermann et Cie, PARIS (1948).
107. FABRE R., TRUHAUT R. :
Métabolisme des solvants.
Ann. Med. Leg. (1949), 29, 233.
108. FABRE R., TRUHAUT R. :
Le problème des solvants de remplacement du benzène dans ses rap-
ports avec l'hygiène industrielle.
Rapport présenté au XIe Congrès International de Médecine du
Travail de NAPLES (13-19 Sept. 1954).
cf. C. R. de Congrès, p. 137.
109. FABRE R. :
Observations sur l'intérêt du dosage des sulfoconjugués urinaires
pour la diagnose des intoxications professionnelles par les hy-
drocarbures benzéniques.
Ann. Pharm. Fran. (1954), 12, 631.

110. FABRE R., TRUHAUT R., LAHAM S., PERON A. :
Recherche toxicologique sur les solvants de remplacement du benzène : étude du toluène.
Arch. Mal. Prof. (1955), 16, 197.
111. FABRE R., TRUHAUT R., LAHAM S. :
Study of the metabolism of xylenes in the rat, guinea pig and rabbit.
C. R. Acad. Sci. (1960), 250, 2655.
112. FABRE R., TRUHAUT R., LAHAM S. :
Recherches sur le métabolisme comparé des xylènes ou diméthylbenzène.
Arch. Mal. Prof. (1960), 21, 314.
113. MILLER F., ANGLER V. :
Detection of para cresol in spot test analysis.
Anal. Chem. (1961), 33, 89.
114. FIDELIPI E. :
Azione fisiologica e comportamento di alunni derivati del benzene in confronto con quelli del ciclo esono.
Arch. Farmacol. Sper. (1914), 18, 178.
115. FISEROVA - BERGEROVA V. :
Determination of phenol in urine.
Pracov. Lekar. (1954), 6, 352.
116. FOLIN O. :
On sulfate and sulfur determinations.
J. Biol. Chem. (1905), 1, 131.
117. FOLIN O., FLANDERS F. :
A new method for the determination of hippuric acid in urine.
J. Biol. Chem. (1912), 11, 257.

118. FOLIN O., DENIS W. :
A colorimetric method for the determination of phenols and phenols derivatives in urine.
J. Biol. Chem. (1915), 22, 305.
119. FOLIN O., DENIS W. :
The excretion of free and conjugated phenols and phenols derivatives.
J. Biol. Chem. (1915), 22, 309.
120. FORSMANN S., FRYKHOLM K.O. :
Benzene poisoning.
II. Examination of workers exposed to benzene with reference to the presence of ester sulfate, muconic acid, urochrome A and polyphenols in the urine together with vitamin C deficiency.
Acta Med. Scand. (1947), 128, 256.
121. FORSTER V., MALINAKOVA M. :
Comments on the method of estimating phenol in the urine by means of dibromoquinone chlorimide.
Pracov. Lekar. (1961), 13, 82.
122. FREEDMANN R.W., CHARLIER G.O. :
Quantitative analysis of low boiling phenols by capillary column separation of trimethylsilyl ethers.
Anal. Chem. (1964), 36, 1880.
123. FRIDLAND I.B. :
Phenol formation from benzene and some of its homologues in the animal organism.
Farmakol. i Toksikol. (1970), 33, 499.
124. FRIEDMANN F. :
Zur kenntnis des abbaues des karbonsäuren im tierkörper.
XIV. Mitteilung über dehydrierung im tierkörper.
Biochem. Z. (1911), 35, 49.

125. FRIESTAD H.O., OTT D.E., GUNTHER F.A. :
Automated colorimetric microdetermination of phenols by oxidative coupling with 3 méthyl 2 benzothiazolinone hydrazone.
Anal. Chem. (1969), 41, 1750.
126. FRITZ J.S., HEDRICK C.E. :
Separation of phenols by reversed phase chromatography.
Anal. Chem. (1965), 37, 1015.
127. FRITZGERALD J.S. :
Gas chromatography applied to the analisis of phenols.
Australian J. Appl. Sci. (1959), 10, 169.
128. FUCHS D., SOOS A.V. :
Über die verbrennung des benzols im organismus des menschen.
Z. Physiol. Chem. (1916), 98, 11.
129. GAFFNEY C.N. :
The quantitative determination of hippuric acid.
J. Biol. Chem. (1954), 206, 695.
130. GAREL J.P. :
Chromatographie en couche mince.
B. Application en chimie organique.
Bull. Soc. Chim. Fr. (1965), 1563.
131. GARKAVI P.G., STEPANOVA N.G., VLANOVA I.P., SAMOILOVA L.M. :
The disturbance in hippuric acid synthesis in white rats poisoned by industrial chemicals.
Ref. : Zh. Otd. Uyp. Farmakol. Khimioter. Sredsna. Toksikol. (1967), n° 6 - 54 - 914.
132. GARTON C.A., WILLIAMS R.T. :
The fates of quinol and resorcinal in the rabbit in relation to the metabolism of benzene.
Biochem. J. (1949), 44, 234.

133. GARTON G.A., ROBINSON D., WILLIAMS R.T. :
Studies in detoxication.
The characterization of phenyl glucuronide and its rate of hydrolysis compared with that of phenylsulfuric acid.
Biochem. J. (1949), 45, 65.
134. GARTON G.A., WILLIAMS R.T.;
Studies in detoxication.
The fate of phenol, phenyl sulfonic acid and phenyl glucuronide in the rabbit in relation to the metabolism of benzene.
Biochem. J. (1949), 45, 158.
135. GASPARIC J. :
Identifizierung organischer verbindungen XL Mitteilung chromatographische methoden zur analyse der genische von alkylierten phenolen.
J. Chromatog. (1961), 5, 408.
136. GASSNER K., FRIEDEL H. :
Turbidimetrische sulfatbestimmung in phosphorsäure und phosphorsäuren salzen.
Z. Anal. Chem. (1956), 152, 420.
137. GERARDE H.W. :
Toxicology and biochemistry of aromatic hydrocarbon.
Elsevier. (1960).
138. GERARDE H.W. :
A gravimetric method for the determination of inorganic and ethereal sulfate in urine.
Amer. Industr. Hyg. Ass. J. (1960), 21, 511.
139. GERARDE H.W., LINDEN N.J. :
Toxicological studies on hydrocarbons.
III. The biochemorphy of the phenyl alkanes and phenylalkenes.
Arch. of Industrial. Health. (1959), 19, 403.

140. HIRBS H.D. :
Phenol test. III. The indophenol test.
J. Biol. Chem. (1927), 72, 649.

141. GIBSON D.T., KOCH J.R., KALLIO R.F. :
Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by micro organisms.
I. Enzymatic formation of catechol from benzene.
Biochemistry (1968), 7, 2653.

142. GILLETTE J.R. :
Effect of various inducers on electron transport system associated
with drug metabolism by liver microsomes.
Metab. Clin. Exp. (1971), 20; 215.

143. GODDU R.F. :
Determination of phenolic hydroxyl by near infrared spectrophotometry.
Anal. Chem. (1958), 30, 2009.

144. GCLUBERVA E.A.,:
Changes with age in the detoxifying function of the liver.
Vrachelnse Delo (1965), 4, 124.

145. GOMORI G. :
Determination of phenol in biologic material.
J. Lab. Clin. Med. (1949), 34, 275.

146. GOREN SPRUL S., KLEIJN H.F.W., MOSJAERT A.E. :
Identification and determination of phenols and chlorophenols in
very diluate aqueous solutions by gaz-liquid chromatography, pa-
per chromatography and spectrometry.
Anal. Chim. Acta (1966), 34, 322.

147. GREGORY J.D., LIPMANN F. :
The transfer of sulfate among phenolic compounds with 3'-5' diphosphoadenosine as coenzyme.
J. Biol. Chem. (1957), 229, 1081.
148. GRIFFITH W.H. :
Benzoylated amino acids in the animal organism.
A method for the determination of hippuric acid and a study of the synthesis of hippuric acid in rabbits.
J. Biol. Chem. (1926), 69, 197.
149. DIEFFROY W. :
Inhalationsversuche an tieren zur bestimmung des oxidation abbau von eingeatmeten benzol und toluol.
Dissertation, Hannover (1934)
In Lehmann KB and Flury F : Toxikologie und hygiene der technischen logungsmittel, BERLIN, (1938).
150. HAKKINEN I.P.T. :
Spectrophotometric determination of sulfate in serum and urine with barium chloranilate.
Scand. J. Clin. lab. Investigation (1959), 11, 294.
151. HANKE M.T., KOESSLER K.K. :
Studies on proteinogenous amines.
XIV. A micro chemical colorimetric method of estimating tyrosine, tyramine and other phenols.
J. Biol. Chem. (1922), 50, 235.
152. HANKE M.T., KOESSLER K.K. :
Studies on proteinogenous amines.
XV. A quantitative method of the separation and estimation of phenols including phenol, o, m, and p-cresol, ...
J. Biol. Chem. (1922), 50, 271.

153. HANNINEN O. :
On the metabolic regulation in the glucuronic acid pathway in the
rat tissues.
Amer. Acad. Sci. Fenn. Sera II Chem. (1968), 142, 7.
154. HASEGAWA H., SATO M., KAKIZAKI :
Metabolism of benzene.
III. Sulfate conjugation of phenols produced from benzene.
Ind. Health. (1967), 5, 41.
155. HAYAISHI O., HASHIMOTO K. :
Pyrocatecase a new enzyme catalyzing oxidative breakdown of pyro-
catechin.
J. Biochem. (1950), 37, 371.
156. HAYAISHI O., KATAGIRY M., ROTHBERG S. :
Studies on oxygenases : pyrocatechase.
J. Biol. Chem. (1957), 229, 905.
157. HEISTAND R.N. :
Automated determination of catechol in urine.
Amer. Indust. Hyg. Ass. J. (1969), 30, 66.
158. HEMINGWAY A., PRYDE J., WILLIAMS R.T. :
The biochemistry and physiology of glucuronic acid.
The site and mechanism of the formation of conjugated glucuronic
acid.
Biochem. J. (1934), 28, 138.
159. HENSEL M. :
Zur methodik der phenolbestimmung im harn.
Z. Physiol. Chem. (1912), 78, 373.

160. HRIVNAK J., MACAK J. :
Gas chromatographic analysis of phenol and substituted methyl
phenols using open tubular columns.
Anal. Chem. (1971); 43, 1039.
161. HRIVNAK J., BESKA E. :
Gas chromatographic separation of methyl phenols on tricresyl
phosphates using open tubular columns.
J. Chromatog. (1971), 54, 277.
162. HUNTER C.J. :
Solvents with references to studies on the pharmacodynamics of
benzene.
Proc. Roys. Soc. Med. (1968), 61, 913.
163. IKEDA M. :
Enzymatic studies on the benzene intoxication.
J. Biochem. (1964), 55, 231.
164. IKEDA M., OHTSUJI H. :
Hippuric acid, phenol and trichloroacetic acid levels in the urine
of Japanese subjects with no known exposure to organic solvents.
Brit. J. Industr. Med. (1969), 26, 162.
165. IKEDA M., OHTSUJI H. :
Significance of urinary hippuric acid determination as an index
of toluene exposure.
Brit. J. Industr. Med. (1969), 26, 244.
166. ILIC V., DELIC V., DJURIC D. :
On the determination of sulfates in the urine of persons exposed
to benzene.
Arch. Farm. (1964), 14, 299.

167. INGBERMAN A.K. :
The functionality of phenols by bromination.
Anal. Chem. (1958), 30, 1003.
168. INGLETT J.E., LODGE J.P. :
Comparative phenolic spot tests.
Anal. Chem. (1959), 31, 248.
169. JAFFE M. :
Über die aufspaltung des benzolrings im organismus.
I. Mitteilung : das auftreten von muconsaure im harn nach dar-
reichung von benzol.
Z. Physiol. Chem. (1909), 62, 58.
170. JAMES S.P. :
Separation of mercapturic acid and related compounds by gas chro-
matography and a method for the determination of hippuric acid.
J. Chromatog. (1967), 26, 255.
171. JASERISKI T., SMAGOWSKI H. :
Titration potentiométrique des acides en milieux non aqueux.
Zeszytg Nank. Fiz. Chem. Wysezaszkola||Pedagog. GDANSK (1965), 5, 43.
172. JEPHCOTT C.M., BULMER F.M.R. :
The urinary system test on the supervision of workers exposed to
benzene.
J. Ind. Hyg. Tox. (1939), 21, 132.
173. JINDRICOVA J. :
The relationship between the phenol content in urine and the ben-
zene content to atmosphere.
Pracov. Lekar. (1958), 10, 131.

174. JONESCU D. :
Über das schicksal der kresole im organismus und ihren einflub auf
den stoffwechsel und die dormfäulnis der fleischfresser.
Biochem. Z. (1906), 1, 399.
175. JOSSELIN J. :
Recherches spectrométriques sur la réaction de MILLON.
Thèse de Pharmacie BORDEAUX. (1961).
176. KAPISINKA V., KOSLJAR V. :
Separation of cresol isomers by paper chromatography and their de-
termination with Eri 10 photometer.
Chem. Prum. (1967), 17, 43.
177. KARLAMPOWI C.I.G., DIMOSKOVSKIKH V.V., VIVOGRADOVA V.N., SHOB G.A. :
Use of gas liquid chromatography for analysis of phenols.
Probl. Anal. Khim. (1970), 1, 70.
178. KARR C., BROWN P.M., ESTEP P.A. :
Identification and determination of low boiling phenols in low
temperature coal tar.
Anal. Chem. (1958), 30, 1413.
179. KAWAHARA F.K. :
Microdetermination of derivatives of phenols and mercaptans by
means of electron capture gas chromatography.
Anal. Chem. (1968), 40, 1009.
180. KEEL H. :
Hippuric acid analysis in urine using the Hofmann rearrangement.
Clin. Chem. (1967), 13, 475.
181. KINGSBURY E.B. ; SWANSON W.W. :
A rapid method for the determination of hippuric acid in urine.
J. Biol. Chem. (1921), 48, 13.

182. KITAGAWA M. :
Studies on the oxidation mechanism of methyl group.
J. Biochem. (1956), 43, 553.
183. KLEEMAN C.R., TABORSKI E., EPSTEIN F.H. :
Improved method for determination of inorganic sulfate in biologic fluids.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (1956), 91, 480.
184. KNOOP F., GEHRKE M. :
Über die oxydation von essigsäure, aceton und toluol.
Z. Physiol. Chem. (1925), 146, 63.
185. KOLSEK J., MATICIL M. :
Beitrag zur gaschromatographischen bestimmung limwertigen phenole
ous dem schwelteer.
J. Chromatog. (1963); 12, 305.
186. KONDO H., SAKURAI H., ONODERA M. :
Glucuronic acid excretion in urine of rabbits by exposure to toluene, xylene and carbon disulfide.
Jap. J. Hyg. (1964), 19, 219.
187. KONISHI K., MORI Y., TANIGUCHI N. :
Quantitative analysis of mixtures of alkylphenol isomers by fluorine-19 magnetic resonance spectroscopy.
The Analyst. (1969), 94, 1002.
188. KOPPESCHAAR W.E. :
Maassanalytische vestiunnung des phenols.
Z. Anal. Chem. (1876), 15, 233.
189. KORENMANN I.M., GANINA V.G., BARANCHIKOVA G.A. :
Vanadates of iodo derivatives of 8 hydroxy quinoline as reagents for phenols.
Tr. Khim. Khim. Tekhnol. (1969), 2, 124.

190. KOSSLER A., PENNY E. :
Über die maasanalytische bestimmung den phenole im harn.
Z. Physiol. Chem. (1893), 17, 117.
191. KRAUS I., OULKIN S. :
The determination of hippuric acid in urine.
J. Lab. Clin. Med. (1941), 26, 729.
192. KREYENBUHL A., WEISS H. :
Analyse des phénols par chromatographie en phase gazeuse.
Bull. Soc. Chim. (1959), 11-12, 1880.
193. KRISHNAMURTHY J.V.G., SAXENA O.C. :
Micro-dosage de l'acide hippurique.
Chim. Anal. (1970), 52, 772.
194. KUDRYAVTSEVA N.A. :
Separation of cresols, xylenols and ethylphenols by gaz liquid chromatography.
Gaz Khromatog. (1969), 10, 116.
195. KUHN R., LOW J. :
Zur kenntnis der methyloxydationen im tierkörper.
Z. Physiol. Chem. (1939), 259, 190.
196. KULZ E. :
Veber einige gepaarte glykuronsäuren.
Z. Biol. (1891), 27, 247.
197. KUSHNIR I., BARR A., CHORTYK O.T. :
An improved quantitative method for volatile phenols.
Anal. Chem. (1970), 42, 1619.
198. LACOSTE R.J., VENABLE S.H., STONE J.C. :
Modified 4 amino antipyrine colorimetric method for phenols.
Anal. Chem. (1959), 31, 1246.

199. LAHAM S. :
Metabolism of industrial solvents.
Industrial Med. surg. (1970), 39, 61.
200. LAHAM S. :
Metabolism of industrial solvents.
I. The biotransformation of benzene and benzene substitutes.
Occup. Health Rev. (1970), 21, 24.
201. LANDAULT C., GUIOCHON G. :
Fast analysis of phenol, methyl phenols and polymethyl phenols,
by gas chromatography using packed capillary columns.
Anal. Chem. (1967), 39, 713.
202. LANDOLT H. :
Brom wasser als reagens ouf phenol und verwoandter körper.
Ber. D. Deutsch. Chem. Gesellsch. (1871), 4, 770.
203. LAZAREW N.W., BRUSILOWSKAYA A.J., LAWROW S.N., LIFSCHITZ F.P. :
Über die durchlassigkeit der haut für benzin und benzol.
Arch. Hyg. Berl. (1931), 106, 112.
204. LEBBE J., LAFARGE J.P., MENARD R.A. :
Recherche et dosage des phénols urinaires par chromatographie en
phase gazeuse.
Arch. Mal. Prof. (1966), 27, 565.
205. LEHMANN K.B.:
quantitative untersuchungen über die aufnahme von benzol durch
tier und mesusch der luft.
Arch. F. Hyg. (1910), 72, 307.
206. LETONOFF T.V., REINHOLD J.G. :
A colorimetric method for the determination of inorganic sulfate
in serum and urine.
J. Biol. Chem. (1936), 114, 147.

207. LEWIS D.A. :
The micro determination of inorganic and total sulfate in urine.
The Analyst. (1962), 87, 566.
208. LIEBEN A. :
Über entstehung von iodoform und onwendung dieser reaktion in der
chemischen analyse.
Ann. Chem. Pharm. suppl. (1870), 7, 218.
209. LINDSAY - SMITH J.R., NORMAN R.O.C., RADDA G.K. :
Quantitative determination of isomeric phenol.
J. Gaz Chromatog. (1964), 2, 146.
210. LINDEMAN L.P., NICKSIC S.W. :
Characterisation of alkylphenols by acetylation and proton magnetic
resonance.
Anal. Chem. (1964), 36, 2414.
211. LOCKE D., SHERMA J. :
Paper solubilization chromatography.
I. Phenols.
Anal. Chim. Acta (1961), 25, 312-316.
212. LOUWERSE H.L. :
Gas liquid chromatographic separation of methyl and methoxy subs-
titued benzene, phenols, phenyls acetates and acetophenols.
J. gas. Chromatog. (1968), 6, 563.
213. MARCINKIEWICZ S., GREEN G., MICHALE D.F. :
Paper chromatography and chemical structure.
II. The chromatography of phenols, alkylphenols. The use of group
and atomic Δ RM values; steric and electronic effect in chromatography.
J. Chromatog. (1963), 10, 42.

214. LARR L.K., STONE R.W. :
Bacterial oxidation of benzene.
J. Bacteriol. (1961), 81, 425.
215. MARTIN W.N., HUSBAND A.M. :
Chromatography of phenols, especially alkylphenols, on paper
impregnated with polyamides.
Anal. Chem. (1961), 33, 840.
216. MAC EVOCY F.A., CARROL J. :
The isolation of rat liver phenolsulfotransferases and the acti-
vation of liver sulfotransferase.
Biochem. J. (1970), 119, 26.
217. MAC EVOCY F.A., J. CARROL :
Purification from rat liver of an enzyme that catalyses the sulfu-
rylation of phenols.
Biochem. J. (1971), 123, 901.
218. MAC KENNA E.T. :
The biology of hydrocarbons.
Ann. Rev. Microbiol. (1965), 12, 188.
219. MAC NAIR H.M., BONNELLI E.J. :
Basic gas chromatography.
Varian Aerograph éd.
220. HEDES G., STRAVERS E. :
Photoelectrometric determination of inorganic sulfate in biological
fluids.
J. Lab. Clin. Med. (1939), 25, 634.
221. MENARD R.A. :
Une nouvelle méthode de détection et de dosage du phénol et du
para crésol dans les urines grâce à la chromatographie en phase
gazeuse.
Thèse Doctorat en Médecine, PARIS (1964).

222. MESSINGER J. :
Über eine neue classe von podieten phenolen.
Ber. D. Chem. Gesellsch. (1889), 22, 2313.
223. MEYER F., KERK L. :
Über die percutane resorption von eserlin aus benzol und einigen
verwandten lösungsmitteln.
Archiv. Toxikol. (1960), 18, 131.
224. MICHAUX, BOITEAU M., TOLOT F. :
Valeur et limites du dépistage clinique et biologique en patholo-
gie professionnelle.
Arch. Mal. Prof. (1971), 32, 97.
225. MIKULSKI P., WIGLUSZ R. :
Simple micromethod for determination of hippuric acid in urine.
Bull. Inst. Mar. Med. GDANSK (1970), 21, 129.
226. MITOMA C. :
Enzymic hydroxylation of aromatic compounds.
Arch. Biochem. Biophys. (1956), 61, 431.
227. MLEJWEK O. :
Analysis of technical cresols by gas chromatography.
Chem. Zvesti. (1968), 22, 591.
228. MOOSER W. :
Beitrag zur kenntnis der aromatischen körper des harns.
Z. Physiol. Chem. (1909), 63, 155.
229. MORAX U. :
Bestimmung der dermfoulniss durch die äthers wefelsäuren im harn.
Z. Physiol. Chem. (1886), 10, 318.

230. MORI Y. :
The decomposition of muconic and adipic acids in the animal body.
J. Biol. Chem. (1918), 35, 341.
231. MOSKOVSKIKH V.V., KARLAMPOVICH G.P., ISAENKO L.L. :
Stationary liquid phases used the chromatographic analysis of phenols.
Z. Fiz. Khim. (1970), 44, 2891.
232. MULLER - OERLINGHAUSEN B., JAHNS R., KUNZEL B., HASSELBLATT A. :
Effect of tolbutamide on blood glucose and glucuronic acid conjugation in liver tissue of normal and adrenalectomized mice.
Nounyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmakol. (1969), 262, 17.
233. MULLER - OERLINGHAUSEN B. :
Impaired formation of glucuronic acid conjugated in liver tissue of diabetic rats.
Nounyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmakol. (1970), 265, 372.
234. MUNK I. :
Zur kenntniss der phenolbildenden substanz im harn.
Pflüger's Archiv. (1876), 12, 142.
235. MUTING D., KELLER H.E., KRAUS W. :
Quantitative colorimetric determination of free phenols in serum and urine of healthy adults using modified diazo-reactions.
Clin. Chim. Acta (1970), 27, 177.
236. NAIR P.M., VAIDYANATHAN C.S. :
A colorimetric method for the determination of pyrocatechol and related substances.
Anal. Biochem. (1964), 7, 315.
237. NALEFSKI L.A., TAKANO F. :
A photonephelometric method for the determination of sulfates in biological fluids.
J. Lab. Clin. Med. (1950), 36, 468.

238. NELSON J.M., DAWSON C.R. :
Tyrosinase.
Advanc. Enzymol. (1944), 4, 991.
239. NENCKI M., GLACOSA P. :
Veber die oxydation der aromatischen kohlen wasserstoffe im
thierkörper.
Z. Physiol. Chem. (1880), 4, 325.
240. NENCKI M., SIEBER N. :
Veber eine nene methode die physiologische oxydation zu messen und
uber den einfluss der gifte und krankheiten auf dieselbe.
Pflug. Arch. Gas. Physiol. (1883), 31, 319.
241. NEUMAERKER H. :
Zur frage der muconsaure bildung aus benzol im tierischen organismus
Z. Physiol. Chem. (1923), 126, 203.
242. NEUBERG C. :
Uber die quantitative bestimmung des phenols im horn.
Z. Physiol. Chem. (1899), 27, 123.
243. NEUBERG C., KRETSCHMER E. :
Uber p-kresol glucuronsäure.
Biochem. Z. (1911), 36, 15.
244. NOMIYAMA K. et H. :
Gas chromatographic determination of benzene metabolites.
J. Chromatog. (1969), 44, 386.
245. NOMIYAMA K., MINAI M., SUSUKI T., KITA H. :
Studies on poisoning by benzene and its homologues :
Median lethal doses of benzene metabolites.
Ind. Health (1967), 5, 143.

246. MIYAMA K. :
Studies on poisoning by benzene and its homologues.
7. Toxicity of benzene metabolites to hemopoiesis.
Ind. Health. (1965), 3, 53.
247. NOSAKA S., KUSUNOSE M. :
Metabolism of hydrocarbons in microorganisms.
I. Oxidation of para xylene and toluene by cell-free enzyme preparations of pseudomonas aeruginosa.
Agric. Biol. Chem. Jap. (1968), 32, 1093.
248. OCHYNSKI F.N. :
The colorimetric determination of phenol.
The Analyst. (1960), 85, 278.
249. OGATA M., SUGIYAMA K, MORIYASU H. :
Méthode de GALENEY modifiée. Relation linéaire entre le taux de toluène dans l'air et le taux d'acide hippurique dans l'urine. Méthode de dépistage de l'acide hippurique par réactif à l'aroylglycine.
Acta Med. Okayama (1962), 16, 283.
250. OGATA M., NAGAO I., TOMOKUNI K. :
Urinary hippuric acid excretion in persons exposed to various concentration of toluene in an exposure chamber.
Jap. J. Ind. Health. (1968), 10, 64.
251. OGATA M., TOMOKUNI K., TAKATSUKA Y. :
Quantitative determination in urine of hippuric acid and m- or p-methyl hippuric acid, metabolites of toluene and m- or p- xylene.
Brit. J. Indust. Med. (1969), 26, 330.
252. OGATA M., TOMOKUNI K. , TAKATSUKA Y. :
Urinary excretion of hippuric acid and m- or p- methyl hippuric acid in the urine of persons exposed to vapors of toluene and m- or p- xylene as a test of exposure.
Brit. J. Indust. Med. (1970), 27, 43.

253. OMURA T., SATO R., COOPER D., ROSENTHAL O., EASTBROOK R.W. :
Function of cytochrome P 450 of microsomes.
Fed. Proc. (1965), 24, 1181.

254. PAGE L., SOSCIA M., VALLETRISCO M., RAVA R., DESTEFANO D. :
The effect of the administration of glucuronamide on the excretion
of conjugated phenol in irradiated rats treated with phenol.
Biochim. Appl. (1968), 15 (2), 72.

255. PAGNOTTO L.D., ELKINS H.B., HEINRICH G., WALKLEY J. :
Industrial benzene exposure from petroleum naphta.
Amer. Ind. Hyg. Ass. J. (1961), 22, 417.

256. PAGNOTTO L.D., LIEBERMAN L.M. :
Urinary hippuric acid excretion as an index of toluene exposure.
Amer. Ind. Hyg. Ass. J. (1967), 28, 129.

257. PARKE D.V., WILLIAMS T.R. :
Studies in detoxication.
Metabolism of benzene. Elimination of the glucuronide fraction of
rabbits urine after administration of benzene. Isolation of phenyl
glucuronide.
Biochem. J. (1951), 48, 621.

258. PARKE D.V., WILLIAMS R.T. :
The metabolism of benzene. The muconic acid excreted by rabbits
receiving benzene. Determination of the isomeric muconic acids.
Biochem. J. (1952), 51, 339.

259. PARKE D.V., WILLIAMS R.T. :
The metabolism of benzene containing $[^{14}\text{C}]$ benzene.
Biochem. J. (1953), 54, 231.

260. PARKE D.V., WILLIAMS R.T. :
The metabolism of benzene. The formation of phenyl glucuronide and
phenylsulfuric acid from benzene. The metabolism of phenol.
Biochem. J. (1953), 55, 337.

251. PASTUSKA G. :
Die kieselgelschicht chromatographic von phenolen und phenol-carbonsäuren.
Z. Anal. Chem. (1961), 179, 355.
252. PAYS M., BOURDON R. :
Dosage colorimétrique des phénols à l'aide du réactif H.M.B.T.
Ann. Pharm. Franc. (1968), 26, 681.
253. PAZDEROVA J., SRBOVA J. :
The importance of benzoic acid estimation in urine for the diagnosis of acute toluene intoxications.
Pracov. Lekar. (1964), 16, 21.
254. PEDRO A., LEHMANN F. :
Characterisation of phenols as their 2-4 dinitrophenyl ethers.
Anal. Chim. Acta. (1971), 54, 321.
255. PELLERIN F., CHASSET R. :
Identification et dosage de composés phénoliques par spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet.
Rôle du pH et applications analytiques.
Ann. Pharma. Franc. (1968), 26, 421.
256. PELLERIN F., CHASSET R. :
Dosage des phénols par spectrophotométrie dans l'ultra-violet :
II. après transformation en dérivés bromés.
Ann. Pharm. Franc. (1969), 27, 571.
257. PELLERIN F., CHASSET R., LE BARON M.F. :
Dosage des phénols par spectrophotométrie dans l'ultra-violet :
III. Influence de la nature des tampons.
Ann. Pharm. Franc. (1969), 27, 719.
258. PESEZ M., POIRIER P., BARTOS J. :
Pratique de l'analyse organique colorimétrique.
Masson et Cie éd. PARIS (1966).

269. LESLIE M., BARTOS J. :
Sur la colorimétrie des phénols à l'aide de l'amidopyrine (pyra-
midon).
Ann. Pharma. Franc. (1967), 25, 577.
270. PIOTROWSKI J. :
Quantitative evaluation of toluene absorption in men.
Med. prac. (1967), 18, 213.
271. PIOTROWSKI J. :
Evaluation of exposure to phenol : absorption of phenol vapour
in the lungs and through the skin and excretion of phenol in urine.
Brit. J. Indust. Med. (1971), 28, 172.
272. POSNER H.S., MITOMA C., UDENFRIEND S. :
Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds.
Arch. Biochem. Biophys. (1961), 94, 269.
273. POSNER H.S., MITOMA C., UDENFRIEND J. :
Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds.
Arch. Biochem. Biophys. (1961), 94, 280.
274. PORTEOUS J.W., WILLIAMS R.T. :
Studies in detoxication. The metabolism of benzene.
a) The determination of phenol urine with 2-6 dichloroquinone-
chlorimide.
b) The excretion of phenol glucuronic acid and ethereal sulfate by
rabbits receiving benzene and phenol.
Biochem. J. (1949), 44, 46.
275. PORTEOUS J.W., WILLIAMS R.T. :
Studies in detoxication. The metabolism of benzene. The isolation
of phenol, catechol quinone and hydroxy quinol from ethereal sulfate
fraction of the urine of rabbits receiving benzene orally.
Biochem. J. (1949), 44, 56.

276. QUICK A.J. :
The study of benzoic acid conjugation in the dog with a direct quantitative method for hippuric acid.
J. Biol. Chem. (1926), 67, 477.
277. QUICK A.J. :
The conjugation of benzoic acid in man.
J. Biol. Chem. (1931), 92, 65.
278. QUICK A.J. :
The site of the synthesis of hippuric acid and phenyl aceturic acid in the dog.
J. Biol. Chem. (1932), 96, 73.
279. QUICK A.J. :
The relation ship between chemical structure and physiological response. The conjugation of substituted benzoic acids.
J. Biol. Chem. (1932), 96, 83.
280. RADICS - AJTAI I., ARATO E.S. :
Dosage de l'acide hippurique et de l'acide benzoique libre dans l'urine.
Munkavedelem. (1965), 11, 32.
281. RAINSFORD S.G., LLOYD DAVIES T.A. :
Urinary excretion of phenol by men exposed to vapour of benzene : a screening test.
Brit. J. Indust. Med. (1965), 22, 21.
282. REED J.R. :
Structure determination of substituted benzenes by proton magnetic resonance. An empirical treatment of substituent effects and their utility in predicting shifts.
Anal. Chem. (1967), 39, 1586.

203. REIC L. :
A method for the paper chromatographic separation and identification of phenol derivatives, mould metabolites and related compounds of biochemical interest using a reference system.
J. Chromatog. Rev. (1959), 1, 39.
204. RENAULT J., CARLTON M.F. :
Caractérisation par chromatographie en couche mince des phénols à chaînes courtes.
Ann. Pharm. Franc. (1957), 25, 291.
205. RHODE H. :
Die ausscheidung von esterschwefelsäure beim kaninchen verfütterung von phenol, bromphenol, brombenzol.
Z. Physiol. Chem. (1923), 124, 15.
206. RIEDER H.F. :
Bestimmung von benzoesaure neben hippursäure mit hilfe einer Differential spektrophotometrischen methode.
Clin. Chim. Acta. (1957), 2, 497.
207. RILEY R.F. :
Paper partition chromatography of some simple phenols.
J. Am. Chem. Soc. (1950), 72, 5782.
208. RITTENBERG D., SCHOEHEIMER R. :
Studies in protein metabolism. Hippuric acid formation studied with the acid of the nitrogen isotope.
J. Biol. Chem. (1939), 127; 329.
209. ROBBINS P.W., LIPMANN F. :
Isolation and identification of active sulfate.
J. Biol. Chem. (1957), 229, 837.
290. ROBBINS P.W., LIPMANN F. :
Enzymatic synthesis of adenosine 5' phosphosulfate.
J. Biol. Chem. (1958), 233, 686.

291. ROGERS W.F., BURDICK M.P., BURNETT G.R. :
The effect of antibiotics on the excretion of phenolic compounds.
.. Lab. Clin. Med. (1955), 45, 87.
292. ROS-I L., GRANDJAN E. :
L'eliminazione urinaria dei fenoli in animali esposti al trime-
tilbenzolo.
Med. del Lavoro (1957), 48, 523.
293. SAKAMOTO A., INAMORI K., WATANABE I., FUKIWAR E. :
Ring oxidation of benzene : phenol formation.
Osaka Daigaku Zasshi (1957), 9, 345.
294. SAKURAI H., UMEDA M. :
Color reaction of phenols with oxyding agents and phenylhydrazine
or its derivatives.
I. Color reaction of phenols with chloramine T and phenylhydrazine
or its derivatives.
J. Pharm. Soc. Jap. (1962), 82, 1282.
295. SALKOWSKI E. :
Über die Wirkung und des chemische Verhalten des phenols im thieris-
chen organismus.
Pflug. Arch. ges. physiol. (1872), 2, 335.
296. SALKOWSKI E. :
Über den vorgang der harnstoffbildung im thierkörper und deneinflus
der ammoniakalze auf denselben.
Z. Physiol. Chem. (1877), 1, 1.
297. SALKOWSKI E. :
Notizen : 4. Die reduciende substanz des benzoësaureharns.
Z. Physiol. Chem. (1880), 4, 135.

298. SALKOWSKI E. :
Veber die quantitative bestimmung der schwefelsaure und aethero-
schwefelsaure in harn.
Z. Physiol. Chem. (1887), 10, 346.
299. SATO T., FUKUYAMA T., YOSHIKAWA H. :
1,2 dihydro 1,2 dihydroxy benzene and several other substances in
the metabolism of benzene.
J. Biochem. (1963), 53, 23.
300. SATO A., HASEGAWA H. :
Metabolism of benzene.
I. Extraction of benzene hydroxylating enzymes.
Ind. Health. (1967), 5, 24.
301. SATO M., KAKIZAKI T., HASEGAWA H. :
Metabolism of benzene.
II. Hydroxylation of benzene by enzymes extracted from rabbit liver.
Ind. Health. (1967), 5, 29.
302. SAWICKI E., MILLER R., STANLEY T., HAUSER T. :
Detection of polynuclear hydrocarbon and phenols with benzol and
piperonal chlorides.
Anal. Chem. (1958), 30, 1130.
303. SCHENK J.H., SANTIAGO M., WINES P. :
A study of the pi complexes of tetracyanoethylene with phenols,
aromatic hydrocarbons and aryl ethers.
Anal. Chem. (1963), 35, 167.
304. SCHMIDT E.G. :
On ether extraction method for the determination of urine phenols.
J. Biol. Chem. (1942), 145, 533.

305. SCHMIDT E.G. :
Urinary phenols.
IV. The simultaneous determination of phenol and p-cresol in urine.
J. Biol. Chem. (1949), 179, 211.
306. SCHNIEDEBERG O. :
Über oxydationen und synthesen im thierkörper.
Arch. Exp. Path. Pharm. (1881), 14, 288.
307. SCHRECK M.H., YANT W.P., SAYERS R.R. :
A new procedure for the control of benzene exposure.
J. Amer. Med. Ass. (1936), 107, 849.
308. SCHRECK M.H., YANT W.P., PEARCE J.S., PATTY F.A., SAYERS R.R. :
Absorption, distribution and elimination of benzene by body tissues
and fluids of dogs exposed to benzene vapour.
J. Ind. Hyg. Toxicol. (1941), 23, 20.
309. SCHULTZEN O. ; NAUNYN B. :
Über das verhalten der kohlen. Wasserstoffe im organismus.
Arch. Anat. Physiol. (1867), 349.
310. SEDIVEC V., FLECK J. :
Determination of toxic substances and theirs metabolites in biological fluids by gas chromatography.
II. Phenol and para cresol in urine.
Collect. Czech. Chem. Comm. (1970), 35, 242.
311. SEDIVEC V., FLEK J. :
Determination of toxic substances and their metabolites in biological fluids by gas chromatography.
V. Hippuric acid in urine.
Collect. Czech. Chem. Comm. (1970), 35, 3265.

312. SEGAL H.L. :
Sulfate - dependent exchange of pyrophosphate with nucleotide phosphate.
Biochim. Biophys. Acta (1956), 21, 194.
313. SEGAL H.L., MOLOGNE L.A. :
Enzymic sulfurylation of tyrosine derivatives.
J. Biol. Chem. (1959), 234, 909.
314. SENIOR N. :
On investigation of the nephelometric method of estimating inorganic and ester sulfates in urine.
J. Pharm. Pharmacol. (1947), 20, 507.
315. SHERMA J., HOOD L.V.S. :
Thin layer solubilization chromatography.
I. Phenols.
J. Chromatog. (1965), 17, 307.
316. SHERWOOD R.J., CARTER F.W.G. :
The measurement of occupational exposure to benzene vapour.
Ann. Occup. Hyg. (1970), 13, 125.
317. SHULGIN A.T. :
Separation and analysis of methylated phenols as their trifluoroacetate ester derivatives.
Anal. Chem. (1964), 36, 920.
318. SINHA S.N., GABRIELI R. :
A simple method for simultaneous determination of benzoic and hippuric acid in biological fluids.
Clin. Chim. Acta (1968), 19 (2), 313.
319. SLOANE S. :
Hydroxymethylation of the benzene ring.
1. Microsomal formation of phenol via prior hydroxymethylation of benzene.
Biochim. Biophys. Acta (1965), 107, 599.

321. SMITH A.L., KING D.A. :
Determination of the steam-volatile phenols present in cigarette smoke condensate.
I. Colorimetric determination of the total steam-volatile phenols.
The Analyst. (1954), 89, 305.
321. SMITH G.A., SULLIVAN P.J. :
Determination of the steam-volatile phenols present in cigarette smoke condensate.
II. Determination of phenol, cresols and guaiacol by their layer chromatography.
The Analyst. (1954), 89, 312.
322. SMITH J.N., SMITHIES R.M., WILLIAMS R.T. :
The metabolism of alkylbenzenes. Glucuronic acid excretion following the administration of alkylbenzene. Elimination of toluene in the expired air of rabbits.
Biochem. J. (1954), 56, 317.
323. SNAPPER I., LAQUEUR F. :
Bestimmung der hippursäure im harn.
Biochem. Z. (1924), 145, 32.
324. SNYDER R., USUKI F., GONASUN L, BROMFELD E., WELLS A. :
The metabolism of benzene in vitro.
Toxic. Appl. Pharmacol. (1967), 11, 346.
325. SOETBEER F. :
Kontrolle der blumenthal'schen methode der hippursäure bestimmung.
Z. Physiol. Chem. (1902), 35, 536.
326. SPENCER B. :
Sulfate acceptors in rat liver.
Biochem. J. (1960), 77, 294.

327. SRBOVA J., TEISINGER J., SKRAMOUSKY S. :
Absorption and elimination of inhaled benzene in man.
Archs. Ind. Hyg. (1950), 2, 1.
328. SRBOVA J., TEISINGER J. :
Absorption and elimination of toluene in man.
Pracov. Lekar. (1952), 4, 41.
329. STADELER G. :
Über die flüchtigen säuren des harns.
Ann. Chem. Pharm. (1851), 77, 17.
330. STILINOVIC L. :
Practical value of the Rainsford - Davies semi quantitative test
for determination of phenol in the urine of workers exposed to
benzene vapours.
Arhiv Hig. rada. Tokaokol. (1967), 18, 341.
331. SUNDT E. :
Paper chromatography of phenols.
J. Chromatog. (1961), 6, 475.
332. SVOBODOVA D. :
Photometric determination of phenol with amino 4 antipyrine.
Acta Fac. Pharm. Univ. Comeniana (1969), 17, 33.
333. SVOBODOVA D., GASPARIC J. :
Color reaction of phenols with amino 4 antipyrine.
Mikrochim. Acta (1971), 2, 384.
334. SWEETLEY C.C., WILLIAMS E.M. :
Micro-analytical determination of urinary aromatic acid by gas
chromatography.
Anal. Biochem. (1961), 2, 83.

333. SYBIL F.C., MARING R.H., WHITE D.A. :
Separation of mercapturic acids and related compounds by gas chromatography and a method for the determination of hippuric acid.
J. Chromatog. (1967), 26, 255.
335. SZEWICZYK J. :
Determination of univalent phenol in water solutions by gas-liquid chromatography.
Doks. Smola Gaz. (1968), 13, 355.
337. TALLON G.R., NEPNER R.D. :
Determination of para-cresol in industrial waste waters.
Anal. Chem. (1958), 30, 1521.
338. TAMM A.O., KOKK H.E., MIKELSAAR A.E. :
Excretion of urinary volatile phenols in case of protein diet, short period introduction of tetracycline and intestinal obstruction.
Eer. Ulikooli Toimesied (1968), 215, 275.
339. TAMM A.O. :
Colorimetric determination of urinary volatile phenols.
Vop. Med. Khim. -(1969), 15, 553.
340. TAMM A.O. :
Urinary volatile phenols in patients with intestinal obstruction.
Scand. J. Gastroenterol. (1971), 6, 5.
341. TEAGUE R.S. :
The conjugates of D-glucuronic acid of animal origin.
Advanc. Carbohyd. Chem. (1954), 9, 185.
342. TEISINGER J., SKAMOVSKY J. :
The importance of determination of benzene in urine of workers exposed to benzene.
Casop. Lek. CesK. (1945), 84, 523.

343. TEISINGER J., BERGEROVA - FISEROVA V., KUORNA J. :
The metabolism of benzene in man.
Pracov. Lekar. (1952), 4, 175.
344. TEISINGER J., FISEROVA - BERGEROVA V. :
La relation entre les tests sulfatiques et phénoliques dans l'urine
et la concentration du benzène dans l'atmosphère.
XIe Congrès Intern. de Med. de NAPLES 13-19 Sept. 1954.
Tome II des Actes du Congrès.
345. TEISINGER J., SRBOVA J. :
Correlation between excreting of benzoic acid in urine and the maxi-
mal permitted dosis of toluene in the air.
Pracov. Lekar. (1954), 6, 332.
346. TEISINGER J., SRBOVA J. :
Elimination de l'acide benzoïque dans l'urine et son rapport avec
la concentration maximum tolérable de toluène dans l'air.
Arch. Mal. Prof. (1955), 16, 216.
347. TEISINGER J., FISEROVA - BERGEROVA V. :
Valeur comparée de la détermination des sulfates et du phénol
contenus dans l'urine pour l'évaluation de la concentration du
benzène dans l'air.
Arch. Mal. Prof. (1955), 16, 221.
348. TEISINGER J. :
Tests biologiques d'exposition.
Pracov. Lekar. (1959), 11, 153.
349. TEUCHY H., VAN SUMERE C.F. :
Quantitative thin layer chromatographic determination of hippuric
acid in rat urine.
Clin. Chim. Acta (1969), 25, 79.

350. MULLIS A.C., BENEDICT S.R. :
Determination of phenols in the blood.
J. Biol. Chem. (1924), 61, 67.
351. THIELEMANN H. :
Thin layer chromatographic separation of isomeric cresols, phenol, naptol, as coupling products with 1-phenyl 2-3 dimethyl 4-amino pyrazole 5 one.
352. THIELEMANN H. :
Paper and thin layer chromatographic studies on the separation of phenols, 3 cresols and xylenols with the fast red AL.
Zeitschrift für Naturforschung (1969), 18, 136.
353. THIELEMANN H. :
Thin layer chromatographic separation of phenol, isomeric cresols, dimethyl phenols and naptols, after reaction with 1-phenyl 2-3 dimethyl 4-amino pyrazolone and after formation of azo dyes.
Pharmazie (1970), 25, 418.
354. THIELEMANN H. :
Thin layer chromatographic separation of isomeric cresols, dimethyl phenols and naptol as coupling products with diazoted 4 benzoyl amino diethyl oxy aniline.
J. Anal. Chem. (1971), 253, 38.
355. THIELEMANN H. :
Problems of thin layer chromatographic separation of positional isomers of dimethyl phenol.
Pharmazie (1971), 26, 92.
356. THIER FELDER H., KLENK F. :
Zur kenntnis des verhaltens des aceto amenons und benzols im tier-körper.
Z. Physiol. Chem. (1924), 141, 29.

357. TIUNOV L.A., SOKOLOVA T.I., BANDMAN A.L. :
Benzene transformation in the liver of experimental animals and man.
Farmakol. Toksikol. . (1969), 32, 185.
358. FOLNIES G., BALAY B. :
Photonephelometric microdetermination of sulfate and organic sulfur.
Anal. Chem. (1953), 25, 160.
359. FOLIDA I., NAKAJIMA M. :
Sur le métabolisme des benzolglykols.
II. Stoffwechsel des benzolglykols und mucondialdehyde.
J. Physiol. Chem. (1960), 318, 171.
360. FRANCAULT J. :
Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse.
Masson éd. (p. 9).
361. KUPCHENKO A.I., OPELDEMANSKAYA G.I., TIKHONOV V.V. :
Spectrophotometric determination of small currents of phenols.
Zh. Anal. Khim. (1970), 25, 1815.
362. BRON J.F., CRUTO FIELD W.D. :
Industr. et Engin. Chem. Anal. (1942), 14, 119.
Rapid turbidimetric method for determination of sulfates.
363. FRANCAULT R. :
Transformations métaboliques des toxiques organiques. Intérêt de
leur étude.
Ann. Pharm. Fran. (1953), 11, 46.
364. FRUHAUT R. :
Sur la fixation d'une limite tolérable pour le benzène dans les
ambiances de travail.
Arch. Mal. Prof. (1958), 29, 5.

360. ISCHERNIKOFF A.M., GADASKIN I.D., GUEWITSCH I.J. :
Ann. Expt. Biol. Pharmacol. (1960), 15, 222.
10 pages. 10 refs., 10 refs. (107).
361. TSURUTA A., KINURA M., SATO M., HASEGAWA H. :
Bone marrow of rabbits injected with ^{14}C labelled benzene.
Ind. Health. (1964), 2, 11.
362. UMLER R. :
Colorimetric method for hippuric acid.
Clin. Chem. (1963), 9, 91.
363. UEDA M. :
Colore reaction of phenols with 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and cerium ammonium sulfate and its applications to colorimetric determination of phenol.
J. Pharm. Soc. Jap. (1963), 83, 951.
364. UEDA M. :
Color reaction of phenol with 1-nitroso 2-naphthol.
J. Pharm. Soc. Jap. (1964), 84, 836.
365. VAN HAFFTEN A.B., SIE S.T. :
The measurement of phenol in urine by gas chromatography as a check on benzene exposure.
Amer. Indust. Hyg. Assoc. J. (1965), 26, 52.
366. VAN NESTER G.F. :
Quantitative investigation on the hippuric acid formation in healthy and diseased individuals.
Chin. Chim. Acta. (1969), 26, 85.
367. VERA M.L. :
Microdosage de l'acide hippurique.
Chim. Anal. (1969), 51 (9), 432.

373. VIGNOLI L., CRISTAU, B., MOREL M.C., CASAL P. :
Modification de la méthode de THEIS et BENEDICT en vue de la caractérisation et du dosage des composés phénoliques par spectrophotométrie.
Bull. Soc. Pharm. MARSEILLE (1963), 12, 133.
374. VIGNOLI L., CRISTAU B., MOREL M.C., CASAL P. :
Elimination urinaire des différents composés phénoliques chez le lapin.
Bull. Soc. Pharm. MARSEILLE (1963), 12, 145.
375. VLASAK R. :
The sensibility of phenol test for determining the degree of exposure of persons working with benzene.
Pracov. lekar. (1959), 11, 469.
376. VOLTERRA L. :
Urinary phenols.
II. Their significance in normal and pathological conditions.
Am. J. Clin. Path. (1942), 12, 580.
377. VON OETTINGEN W.T., NEAL P.A., DANAHEUE D. :
The toxicology and potential dangers of toluene.
J. Amer. Med. Ass. (1942), 116, 579.
378. WAELSCH H., BUSZTIN A. :
Über die fermentative bildung von benzanid und hippursäure.
Z. Physiol. Chem. (1937), 249, 135.
379. WALKLEY J.E., PAGNOTTO L.D., ELKINS H.B. :
Measurment of phenol in urine as an index of benzene exposure.
Amer. Indus. Hyg. Assoc. J. (1961), 22, 362.

380. WARSHOWSKY B.O., SCHANTZ E.B. :
Determination of phenol and m-cresol in complex biochemical mix-
tures.
Anal. Chem. (1948), 20, 951.
381. WEICHSELBAUM T.E., PROBSTEIN J.G. :
Determination of hippuric acid in urine.
J. Lab. Clin. Med. (1939), 24, 636.
382. WEXLER A.R. :
Determination of phenolic substances by ultraviolet difference
spectrometry.
Anal. Chem. (1963), 35, 1936.
383. WILLIAMS C.M. :
A new method for the determination of urinary aromatic acid by
gas chromatography.
J. Clin. Endocrinol. Metab. (1961), 21, 1500.
384. WILLIAMS C.M. :
Gas chromatography of urinary aromatic acids.
Anal. Biochem. (1962), 4, 423.
385. WILLIAMS R.T. :
Studies in detoxication.
I. The influence of dose and o-, m- and p- substitution on the
sulfate detoxication of phenol in the rabbit.
Biochem. J. (1938), 32, 878.
386. WILLIAMS R.T. :
Detoxication mechanisms.
The metabolism of drugs and allied organic compounds.
J. WILEY and Sons. 1947.

387. WILLIAMS R.T. :
Detoxication mechanisms.
CHAPMAN and HALL, LONDON 1959.
388. WILSON L.G., BANDURSKI R.S. :
An enzymic reaction involving adenosine triphosphate and selenate.
Arch. Biochem. Biophys. (1956), 62, 503.
389. WOOFF J.B., HERCE J.S. :
Separation of complexe mixtures of polyhydroxy phenols on columns
of sephadex.
J. Chromatog. (1967), 28, 94.
390. WU H., WU D. :
Determination of hippuric acid in normal urine. A study in diffe-
rential extraction.
Fed. Proc. (1952), 11, 314.
391. WUSTEMAN F.S. ; DOGSON K.J. :
Thin layer chromatography in study of ester sulfates.
J. Chromatog. (1964), 16, 334.
392. YANT W.P., SCHRENK H.H., SAYERS R.B. :
Urine sulfate determination as a measure of benzene exposure.
J. Ind. Hyg. Toxicol. (1936), 18, 69.
393. YOUNG J.H. :
The determination of hydroxy benzenes by liquid-liquid partition
chromatography.
The Analyst. (1961), 86, 520.
394. ZAKUPRA V.A., DOBROV V.S. :
Quantitative analysis of alkyl substituted monohydric phenols by
gas liquid chromatography.
Khim. Tekhnol. Topl. Mase. (1969), 14, 54.

315. LEBARSKY S.I., YOUNG L. :

Mercapturic acid.

III. The conversion of benzene to phenyl mercapturic acid in the rat.

J. Biol. Chem. (1943), 151, 487.

396. ZILINIS P. :

Fractional determination of urinary volatile phenols by phenitrazole.

Ann. Pharm. Fran. (1961), 19, 604.

397. ZYCZEWSKA J., RAFAZOWICZ A. :

Hippuric acid and benzoyl glucuronic acid excretion after sodium benzoate loading in healthy persons and in liver damage.

Medycyna Doswiadczalna Mikrobiologia (1963), 15, 349.

T A B L E D E S M A T I E R E S
=====

III.1.1.	La sulfo-conjugaison	25
III.1.2.	La glucurono-conjugaison	26
III.1.3.	La glycy-l-conjugaison	26
III.2.	Application aux métabolites	28
III.2.1.	Phénols	28
III.2.2.	Acides aromatiques	29
III.3.	Facteurs influant sur la conjugaison	29
IV.	<u>Elimination des métabolites</u>	30

CHAPITRE 2ème - DOSAGES DES METABOLITES URINAIRES DU BENZENE, DU TO-
LUENE ET DES XYLENES, UTILISES EN TANT QUE TESTS
D'EXPOSITION

I.	<u>L'acide hippurique</u>	36
I.1.	Les méthodes de dosage	37
I.1.1.	Gravimétrie	37
I.1.2.	Par l'intermédiaire du dosage du glycolle ...	37
I.1.3.	Titrimétrie	37
I.1.4.	Spectrométrie U.V.	38
I.1.5.	Colorimétrie	39
	I.1.5.1. Colorimétrie au PDAB	39
	I.1.5.1.1. Chromatographie sur papier	40
	I.1.5.1.2. Chromatographie sur couche mince	40
	I.1.5.2. Colorimétrie au chlorure de benzène sulfonyl	41
	I.1.6. Fluorimétrie	41
	I.1.7. La chromatographie en phase gazeuse	42
I.2.	Résultats obtenus	42
I.2.1.	Taux normaux urinaires	43
I.2.2.	Augmentation par exposition au toluène	43
I.2.3.	Augmentation par exposition aux xylènes	44
I.2.4.	Autres augmentations	44

	pages
II. <u>Les sulfates</u>	44
II.1. Dosage des sulfates urinaires	45
II.1.1. Gravimétrie	45
II.1.2. Néphélométrie - turbidimétrie	45
II.1.3. Titrimétrie	46
II.1.4. Colorimétrie	46
II.1.5. Complexométrie	47
II.2. Résultats	47
II.2.1. Expression et taux normaux	47
II.2.2. Variations lors de l'exposition au benzène ...	48
II.2.3. Variations lors de l'exposition au toluène ...	48
II.2.4. Variations lors de l'exposition aux xylènes ..	49
II.2.5. Autres variations	49
III. <u>Les phénols</u>	50
III.1. L'hydrolyse	50
III.1.1. Hydrolyse chimique	50
III.1.2. Hydrolyse enzymatique	50
III.2. L'extraction	51
III.3. Techniques de dosage	51
III.3.1. Gravimétrie	52
III.3.2. Titrimétrie	52
III.3.3. Colorimétrie	52
III.3.3.1. Formation de complexe	53
- le chlorure ferrique	53
- le réactif de Millon	53
III.3.3.2. Réduction d'un réactif	55
III.3.3.3. Diazocopulation	55
- acide para sulfonique diazoté	55
- para nitro aniline diazotée	56
- phénitrazole	57
- 3 méthyl 2 benzothiazolinone hy-	
drazone	57
- autres réactifs employés	59

	pages
III.3.3.4. Formation d'indophénol	59
- 2-6 dichloro ou dibromo quinone 4-chlorimide	59
- aniline et hypochlorite	60
- 4 amino antipyrine	60
III.3.3.5. Formation d'éther	61
III.3.3.6. Réactions particulières	62
- substitution en para	62
- méta diphénols	62
III.3.3.7. Réactions diverses	62
III.3.4. Spectrométrie dans l'ultra-violet	62
III.3.5. Spectrométrie en infra-rouge	63
III.3.6. Résonnance magnétique nucléaire (RMN)	63
III.3.7. Méthodes chromatographiques	63
III.3.7.1. Chromatographie d'exclusion-diffusion	64
III.3.7.2. Chromatographie liquide - liquide ..	64
III.3.7.3. Chromatographie sur papier	64
- sur papier seul	64
- sur papier imprégné	65
III.3.7.4. Chromatographie sur couche mince ...	66
1. pour les phénols	67
2. pour les dérivés phénoliques	67
III.3.7.5. Chromatographie en phase gazeuse ...	68
1. pour les phénols tels quels	69
2. phénols estérifiés	69
- méthylation	73
- sililation	73
- acétylation	74
- par un dérivé halogéné	74
III.4. Résultats	75
III.4.1. Taux normaux	76
III.4.2. Variations lors de l'exposition au benzène ...	76

	pages
III.4.3. Variations lors de l'exposition au toluène ou aux xylènes	80
III.4.4. Variations diverses	80
CHAPITRE 3ème - TRAVAUX PERSONNELS	82
I. <u>Description et caractéristiques du chromatographe</u>	83
I.1. Le gaz vecteur	84
I.2. L'injecteur	84
I.3. Les colonnes	86
I.3.1. Imprégnation du support	88
I.3.2. Remplissage et conditionnement des colonnes ..	88
I.3.3. Vérification des performances des colonnes ...	89
I.4. Détecteur - électromètre	90
I.5. L'enregistreur	91
II. <u>La technique</u>	93
II.1. Principe et avantages de l'étalon interne	93
II.2. Choix de l'étalon interne	94
II.3. Protocole	94
II.4. L'hydrolyse	95
III. <u>Analyse qualitative</u>	96
III.1. Méthodes d'identification : étalonnage	96
III.2. Etude de la séparation	96
III.3. Reproductibilité	99
IV. <u>Analyse quantitative</u>	99
IV.1. Etablissement des courbes d'étalonnage	101
IV.2. Précision de la méthode	108
V. <u>Etude des conditions expérimentales</u>	110
V.1. Etude de l'hydrolyse	110
V.1.1. Etude de la perte à l'hydrolyse	110
V.1.2. Etude de l'influence des facteurs de l'hydro- lyse	111

	pages
V.2. Influence du milieu biologique complexe sur les résultats quantitatifs	114
VI. <u>Application à l'analyse des phénols dans les urines</u>	119
VI.1. Caractérisation	119
VI.2. Dosage	125
VI.2.1. Reproductibilité	125
VI.2.2. Minimum de détection	127
VII. <u>Etude critique de la méthode</u>	127
VIII. <u>Résultats</u>	128
VIII.1. Sujets témoins	128
VIII.2. Sujets exposés à un risque connu	129
VIII.2.1. Benzène	129
VIII.2.2. Toluène	137
VIII.2.3. Xylènes	140
VIII.2.4. Chlorobenzène	145
VIII.3. Exposition inconnue	145
<u>CONCLUSION</u>	148
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	151
TABLE DES MATIERES	205

